

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
”NICOLAE TESTEMIȚANU”
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN DOMENIUL ȘTIINȚE MEDICALE**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U:616.24-002.5-07-08+615.2/.3.015.8

DUMITRU CHESOV

**OPTIMIZAREA DIAGNOSTICULUI ȘI EFICIENTIZAREA TRATAMENTULUI
TUBERCULOZEI**

321.07 - FTIZIOPNEUMOLOGIE

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Consultanți:

Victor Botnaru,
dr. hab. șt. med., prof. univ.
USMF ”Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica
Moldova

Christoph Lange
dr. hab. șt. med., prof. univ.
Centrul de cercetări Borstel, Borstel, Germania

Autor:

Dumitru Chesov
dr șt. med., conf. univ.

Chișinău 2023

© Chesov Dumitru 2023

CUPRINS

Cuprins	3
Adnotare.....	6
Аннотация	9
Summary	12
Lista tabelelor	15
Lista figurilor.....	16
Lista abrevierilor.....	18
Introducere.....	20
1. Diagnosticul și tratamentul tuberculozei la etapa actuală (revistă a literaturii)	29
1.1. Noțiuni și definiții	29
1.2. Evoluția indicatorilor epidemiologici ai tuberculozei	31
1.3. Metode de diagnostic microbiologic al tuberculozei	34
1.3.1 Diagnosticul infecției tuberculoase latente	34
1.3.2 Diagnosticul microbiologic al tuberculozei active.....	39
1.3.3 Aprecierea sensibilității la medicamente a <i>M. tuberculosis</i>	45
1.4 Principiile tratamentului farmacologic în tuberculoză	51
1.5 Monitorizarea și evaluarea tratamentului antituberculos.....	58
1.6 Concluzii la capitolul 1	65
2. Răspunsul citokinic specific în diferențierea statutelor clinice ale infecției cu <i>M. tuberculosis</i>	67
2.1. Material și metodă.....	67
2.2 Rezultatele aprecierii răspunsului citokinic	72
2.3 Concordanța dintre IGRA-EliSpot și FluoroSpot	73
2.4 Aprecierea prin FluoroSpot a răspunsului IL-2 și INF- γ indus de ESAT-6	78
2.5 Aprecierea prin FluoroSpot a răspunsului IL-2 și INF- γ indus de CFP-10.....	78
2.6 Acuratețea diagnostică totală a testelor IGRA-EliSpot și FluoroSpot	79
2.7 Sinteza și interpretarea rezultatelor aprecierii profilului citokinic INF- γ IL-2.....	85
2.8 Concluzii la capitolul 2.....	87
3. Optimizarea diagnosticului microscopic al infecției tuberculoase	88
3.1 Material și metodă.....	88

3.2 Caracteristica probelor analizate	93
3.3 Rezultatele examinării manuale și prin Fluorobot a frotiurilor în colorație fluorescentă	93
3.4 Compararea gradării încărcăturii bacteriene apreciată manual versus Fluorobot	96
3.5 Sinteza și interpretarea rezultatelor citirii robotizate a frotiurilor microscopice	97
3.6. Concluzii la capitolul 3	99
4. Tehnici de diagnostic molecular-genetic și specimene alternative	100
4.1 Impactul implementării testării prin Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice la bolnavii cu tuberculoză MDR.....	100
4.1.1. Material și metodă.....	101
4.1.2. Dinamica testării prin Xpert MTB/Rif în perioada de studiu	102
4.1.3 Impactul Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice în cazurile de TB MDR	104
4.1.4 Sinteza și interpretarea rezultatelor aplicării Xpert MTB/Rif.....	106
4.2 Rolul examinării specimenelor bronhoscopice pentru confirmarea microbiologică a tuberculozei.	108
4.2.1 Material și metodă.....	108
4.2.2 Rezultatele examenului microbiologic al probelor de aspirat bronșic	110
4.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor examinării prin teste molecular genetice a specimenelor de aspirat bronșic.....	116
4.3 Concluzii la capitolul 4.....	118
5. Intervenții de eficientizare a tratamentului tuberculozei.....	119
5.1 Impactul asupra rezultatelor tratamentului a includerii badaquilinei în schemele terapeutice la bolnavii cu tuberculoză MDR	119
5.1.1 Material și metodă.....	119
5.1.2 Rezultatele tratamentului la bolnavii cu scheme de tratament cu și fără de badaquilină	123
5.1.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor obținute.....	129
5.2 Utilizarea izoniazidei în tratamentul bolnavilor cu tuberculoză multidrog rezistentă ...	132
5.2.1. Material și metodă.....	133
5.2.2 Spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă la tulpinile MDR de M. tuberculosis în Republica Moldova.....	138

5.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării spectrului mutațiilor asociate cu rezistența fenotipică la izoniazidă.....	140
5.3 Concluzii la capitolul 5.....	142
6. Rezultatele tratamentului antituberculos - factori de prognostic și opțiuni de evaluare	144
6.1 Impactul funcției pulmonare asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză	144
6.1.1. Material și metodă.....	144
6.1.2 Tipul disfuncției pulmonare și asocierea cu rezultatele tratamentului	148
6.1.3 Interpretarea și sinteza rezultatelor de apreciere a asocierii dintre funcția pulmonară și rezultatele tratamentului antituberculos	154
6.2 Evaluarea rezultatelor tratamentului tuberculozei multidrogrezistente.....	156
6.2.1 Material și metodă.....	157
6.2.2. Aprecierea postterapeutică a rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză MDR	158
6.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării postterapeutice a rezultatului tratamentului în tuberculoza MDR.....	163
6.3 Concluzii la capitolul 6.....	165
Concluzii generale și recomandări.....	167
Bibliografie.....	170
Acte de implimentare și certificate de inovator.....	196
Declarația privind asumarea răspunderii.....	202
Curriculum Vitae Dumitru Chesov	203

ADNOTARE

Chesov Dumitru

”Optimizarea diagnosticului și eficientizarea tratamentului tuberculozei”

Teză de doctor habilitat în medicină, Chișinău, 2023

Structura tezei: introducere, șase capitole, concluzii, bibliografia din 307 surse, 29 de figuri, 17 de tabele, Rezultatele studiului au fost publicate în 51 de lucrări științifice.

Cuvinte cheie: TB, MDR, diagnostic de laborator, *M. tuberculosis*, tratament antituberculos.

Domeniul de studiu: Medicină generală. Pneumoftiziologie.

Scopul cercetării: Evaluarea intervențiilor clinice și de laborator cu potențial de optimizare a diagnosticului și de eficientizare a tratamentului bolnavilor de tuberculoză.

Obiectivele cercetării: Aprecierea eficacității determinării răspunsului celular periferic specific prin interferon- γ și interleukina-2 în diferențierea statutelor clinice ale infecției prin *M. tuberculosis*; Evaluarea acurateței diagnostice a citirii automatizate a frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă prin platforma Fluorobot în diagnosticul tuberculozei pulmonare la adulți; Determinarea impactului implementării tehnicii GeneXpert MTB/Rif asupra managementului terapeutic la bolnavii cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă în Republica Moldova; Determinarea rolului evaluării specimenelor de aspirat bronșic în diagnosticul tuberculozei pulmonare la pacienții cu specimene paucibacilare ale sputei liber expectorate; Aprecierea eficacității includerii badaquilinei în schemele de tratament al tuberculozei multidrog rezistente în condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză; Evaluarea raționalității includerii izoniazidei în doze mari în schemele terapeutice utilizate la bolnavii cu tuberculoza multidrog rezistentă; Aprecierea impactului funcției respiratorii la momentul diagnosticului asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză pulmonară; Evaluarea opțiunilor de apreciere a rezultatelor tratamentului la bolnavii de tuberculoză.

Noutatea și originalitatea științifică. Noutatea cercetării este dată de evaluarea eficacității aplicării de noi biomarkeri (profilul citokinic IL-2/INF- γ al limfocitelor din sângele periferic), specimene alternative (aspirat bronșic) și soluții tehnologice originale (FluoroSpot, Fluorobot, Xpert MTB/Rif) în scopul diagnosticării infecției tuberculoase în practica clinică. La fel, noutatea studiului este asigurată de aprecierea eficacității și/sau raționalității aplicării în condițiile clinice de rutină din cadrul sistemului de sănătate din Republica Moldova a unor medicamente noi precum badaquilina sau dozelor mari de izoniazidă, de rând cu identificarea de noi factori predictivi ai eficacității tratamentului antituberculos și aplicării unor abordări mai obiective, din punct de vedere clinic, în aprecierea rezultatelor tratamentului antituberculos.

Rezultatele noi pentru știință și practică: Fluorospot - ul reprezintă o metodă alternativă pentru diagnosticul infecției tuberculoase latente cu acuratețe diagnostică similară cu cea a tehnicilor IGRA-EliSpot; Aplicarea tehnologiilor pe bază de deep learning algorithm precum Fluorobotul permite citirea automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu o acuratețea comparabilă cu cea obținută la citirea manuală; Aplicarea la scară națională a tehnicii Xpert MTB/Rif în diagnosticul tuberculozei a permis reducerea întârzierii terapeutice de 6 ori la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR; Utilizarea specimenelor de aspirat bronșic testate prin teste molecular-genetice (Xpert MTB/Rif) la bolnavii cu tuberculoză pulmonară cu paucibacilaritate înaltă (microscopie și Xpert MTB/Rif negative în probele de spută liber expectorată) permite confirmarea microbiologică adițională la o pătrime dintre acești bolnavi.; Badaquilina utilizată în schemele de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR, inclusiv la cei cu eșec a tratamentelor anterioare, în condițiile oferirii îngrijirilor medicale în mod programatic asigură o rată înaltă de vindecare și reducerea mortalității; Rezistența față de izoniazidă la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova este în majoritatea covârșitoare a cazurilor determinată de mutații în gena katG (asociate cu niveluri înalte ale concentrațiilor minime inhibitorii față de acest medicament), fapt care exclude administrarea empirică a dozelor mari de izoniazidă (15-20 mg/kg) în schemele de tratament la acești bolnavi; Pattern-ul restrictiv al funcției pulmonare la bolnavii cu tuberculoză pulmonară, apreciat la inițierea tratamentului antituberculos, este un factor predictiv negativ, potențial modificabil, al rezultatelor tratamentului la bolnavii de tuberculoză; Aprecierea rezultatelor tratamentului antituberculos după o perioadă de supraveghere post terapie reprezintă o abordare mai rațională din punct de vedere clinic de evaluare a tratamentului antituberculos, fezabilă în condițiile de îngrijire programatică a bolnavilor de tuberculoză.

Semnificația teoretică. Cercetarea oferă argumentarea teoretică necesară luării deciziilor de optimizare a algoritmilor diagnostice curente de confirmare a infecției tuberculoase prin includerea potențială în acestea a testelor serologice de apreciere a INF- γ și IL-2 secretate de limfocitele T, citirii automatizate a frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă și testării prin teste molecular-genetice a specimenelor de aspirat bronșic la bolnavii cu spută paucibacilară. Argumentarea intervențiilor menționate poate fi efectuată din perspectiva sensibilității, specificității, raportului de probabilitate pozitivă și cel de probabilitate negativă demonstrate în prezenta lucrare. La fel, a fost argumentat impactul implementării la nivel național a tehnicii Xpert MTB/Rif prin aprecierea efectul global asupra reducerii întârzierii terapeutice la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR. În cardul evaluării intervențiilor de eficientizare a tratamentului antituberculos a fost argumentată eficacitatea includerii în schemele de tratament în condiții programatice la bolnavii cu tuberculoză MDR a badaquilinei prin demonstrarea unei rate de

vindecarea mai mare și a mortalității mai reduse la utilizarea acestui medicament precum și ineficacitatea includerii empirice (fără aprecierea determinatei genetice) a izoniazidei în doze mari în schemele de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR. În același context, a fost argumentată raționalitatea și fezabilitatea supravegherii postterapeutice în evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos.

Valoarea aplicativă. Aplicarea intervențiilor evaluate în cadrul lucrării permite reducerea întârzierii diagnostice la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR, creșterea semnificativă a confirmării microbiologice a tuberculozei pulmonare la bolnavii cu spută paucibacilară, precum și optimizarea citirii frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă. La fel, utilizarea soluțiilor terapeutice evaluate sunt eficiente în creșterea vindecării și reducerea ratei de mortalitate la bolnavii cu tuberculoză MDR, precum și evitarea tratamentelor neargumentate cu doze mari de izoniazidă cu potențial efect hepatotoxic la acești bolnavi. Utilizarea aprecierii eficacității tratamentului după supravegherea postratament oferă o evaluare mai obiectivă din punct de vedere clinic al eficacității terapeutice.

Implementarea rezultatelor științifice. Recomandările studiului sunt utilizate în procesul didactic de pregătire a cadrelor medicale la Disciplina de Pneumologie și Alergologie, precum și în secțiile de fiziopneumologie a IMSP IFP “Chiril Draganiuc”. Au fost înregistrate 3 certificate de inovator și 3 acte de implementare a rezultatelor.

АННОТАЦИЯ

Кесов Думитру

"Оптимизация диагностики и повышение эффективности лечения туберкулеза"

Диссертация доктора наук в области медицины, Кишинев, 2023 г.

Структура диссертации: введение, шесть глав, выводы, библиография из 307 источников, 29 рисунков, 17 таблиц, результаты исследования опубликованы в 51 научной работе.

Ключевые слова: ТБ, МЛУ, лабораторная диагностика, *M. tuberculosis*, противотуберкулезное лечение.

Область исследования: Общая медицина. Фтизиопульмонология.

Цель исследования: Оценка клинических и лабораторных вмешательств, способных оптимизировать диагностику и улучшить лечение больных туберкулезом.

Задачи исследования: Оценить эффективность определения специфического ответа интерферона- γ и интерлейкина-2 периферических клеток в дифференциации клинического статуса *M. tuberculosis*; Оценить диагностическую точность автоматизированного чтения мазков в флуоресцентном окрашивании с помощью платформы Fluorobot в диагностике туберкулеза легких у взрослых; Определить влияние внедрения методики GeneXpert MTB/Rif на ведение пациентов с множественно лекарственно устойчивым туберкулезом легких в Республике Молдова; Определить роль оценки образцов бронхиального аспирата в диагностике туберкулеза легких у пациентов с малобациллярной мокротой; Оценка эффективности включения бедакилина в схемы лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в контексте программного ведения больных туберкулезом; Оценка рациональности включения высоких доз изониазида в схемы лечения пациентов с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью; Оценка влияния параметров респираторной функции на результаты лечения пациентов с туберкулезом легких; Оценка разных подходов определения результатов лечения у пациентов с туберкулезом.

Научная новизна и оригинальность. Новизна исследования заключается в оценке эффективности применения новых биомаркеров (IL-2/INF- γ цитокиновый профиль лимфоцитов периферической крови), альтернативных образцов (бронхиальный аспират) и оригинальных технологических решений (FluoroSpot, Fluorobot, Xpert MTB/Rif) для диагностики туберкулезной инфекции в клинической практике. Также новизна исследования заключается в оценке эффективности и/или рациональности применения в повседневных клинических условиях в рамках системы здравоохранения Республики Молдова новых препаратов, таких как бедакилин или изониазида в высоких дозах. В том числе новизна обусловлена выявлением новых предикторов эффективности

противотуберкулезного лечения и применением более объективных, с клинической точки зрения, подходов в оценке результатов противотуберкулезного лечения.

Новые результаты для науки и практики: Fluorospot представляет собой альтернативный метод диагностики латентной туберкулезной инфекции с диагностической точностью, сходной с точностью методов IGRA-EliSpot; Применение технологий на основе алгоритмов глубокого обучения, таких как Fluorobot, позволяет автоматизированное чтение микроскопических мазков в флуоресцентном окрашивании с точностью, сравнимой с точностью, получаемой при ручном чтении; Общенациональное внедрение метода Xpert MTB/Rif в диагностике туберкулеза позволило в 6 раз сократить задержку терапии у пациентов с МЛУ туберкулезом легких; Использование образцов бронхиального аспирата, протестированных молекулярно-генетическими тестами (Xpert MTB/Rif) у пациентов с туберкулезом легких малобацилярной мокротой (микроскопия и Xpert MTB/Rif отрицательны) позволяет получить дополнительное микробиологическое подтверждение заболевания у четверти этих пациентов; Использование бедакилина в схемах лечения пациентов с МЛУ ТБ, включая тех, кто ранее не получал лечения, при программном оказании помощи обеспечивает высокий процент излечения и снижение смертности; Резистентность к изониазиду у больных МЛУ ТБ в Республике Молдова в подавляющем большинстве случаев обусловлена мутациями в гене *katG* (ассоциированными с высокими уровнями минимальных ингибирующими концентрациями этого препарата), что исключает эмпирическое назначение высоких доз изониазида (15-20 мг/кг) в схемах лечения этих пациентов; Рестриктивный паттерн функции легких у пациентов с туберкулезом легких, оцененный в начале противотуберкулезного лечения, является потенциально модифицируемым негативным предиктором результатов лечения пациентов с туберкулезом; Оценка результатов противотуберкулезного лечения после периода постлечебного наблюдения является более клинически рациональным подходом в оценке противотуберкулезного лечения, осуществимым в условиях программного ведения пациентов с туберкулезом.

Теоретическая значимость. Исследование дает теоретическое обоснование для принятия решений по оптимизации текущих диагностических алгоритмов подтверждения туберкулезной инфекции путем потенциального включения серологических анализов для оценки INF- γ и IL-2, секретируемых Т-лимфоцитами, автоматизированного чтения микроскопии мазков в флуоресцентной окраски, и молекулярно-генетического тестирования образцов бронхиального аспирата у пациентов с малобацилярной мокротой. В представленной работе аргументация указанных вмешательств проведена с точки зрения чувствительности, специфичности, отношениях правдоподобия положительного и

отрицательного результатов. Также, в диссертации было доказанно положительный эффект общенационального внедрения метода Xpert MTB/Rif на ведение больных с туберкулезом путем оценки общего влияния на снижение задержки терапии у пациентов с МЛУ туберкулезом. При оценке мероприятий по повышению эффективности лечения туберкулёза эффективность таких как включения бедакилина в схемы лечения в программных условиях у больных с МЛУ туберкулезом были доказаны более высокая частота излечения и более низкая смертность при использовании этого препарата, а также неэффективность, эмпирического включения (без оценки генетических детерминант), высоких доз изониазида в схемы лечения больных МЛУ туберкулёзом. В этом же контексте была аргументирована рациональность и целесообразность постлечебного наблюдения при оценке результатов лечения туберкулёза.

Практическое значение. Внедрение интервенций, исследованных в данной работе, позволяет сократить диагностическую задержку у пациентов с МЛУ туберкулезом легких, значительно увеличить микробиологическое подтверждение туберкулеза легких у пациентов с малобациллярной мокротой и оптимизировать чтение микроскопии мазков в флуоресцентной окраске. Также, использование исследованных терапевтических вмешательств эффективно для увеличения излечения и снижения смертности у пациентов с МЛУ туберкулёзом, а также позволяет избежать неоправданного лечения высокими дозами изониазида с потенциальным гепатотоксическим эффектом у больных туберкулёзом. Использование оценки эффективности лечения после постлечебного наблюдения обеспечивает более объективную, с клинической точки зрения, оценку эффективности лечения.

Внедрение результатов. Научно-практические результаты исследования используются в учебном процессе на Кафедре Пульмонологии и Аллергологии ГУМФ «Николае Тестемицану», а также в отделениях Института фтизиопульмонологии "Кирилл Драганюк". По результатам работы зарегистрировано 3 сертификата рационализации и 3 акта внедрения результатов.

SUMMARY

Chesov Dumitru

"Optimisation of the diagnosis and improvement of the treatment of tuberculosis"

Thesis of doctor habilitatus in medicine, Chisinau, 2023

Thesis structure: introduction, six chapters, conclusions, bibliography containing 307 sources, 29 figures, 17 tables, results of the study were published in 51 scientific papers.

Keywords: TB, MDR, laboratory diagnosis, *M. tuberculosis*, antituberculosis treatment.

Field of study: General medicine. Pulmonology.

Research aim: Evaluation of clinical and laboratory interventions with the potential to optimise diagnosis and to improve treatment of tuberculosis patients.

Research objectives: To assess efficacy of assessment of the interferon- γ and interleukin-2 peripheral cell response in differentiating the clinical statuses of *M. tuberculosis* infection; To assess the diagnostic accuracy of automated reading by Fluorobot platform of the fluorescent stained smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults; To determine the impact of the implementation of GeneXpert MTB/Rif technique on the therapeutic management of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis in the Republic of Moldova; To determine the role of bronchial aspirate specimen evaluation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with paucibacillary free expectorated sputum specimens; To assess the effectiveness of including bedaquiline in multidrug-resistant tuberculosis treatment regimens in the conditions of programmatic management of tuberculosis patients; To assess the rationality of including high-dose isoniazid in treatment regimens used in patients with multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Moldova; To determine the impact of respiratory function assessed at diagnosis on treatment outcomes in patients with pulmonary tuberculosis; To evaluate alternative approaches in assessment of treatment outcomes in tuberculosis patients.

Scientific novelty and originality. The novelty of the research is given by the evaluation of the efficacy of applying new biomarkers (IL-2/INF- γ cytokine profile of peripheral blood lymphocytes), alternative specimens (bronchial aspirate) and original technological solutions (FluoroSpot, Fluorobot, Xpert MTB/Rif) for the diagnosis of tuberculosis infection in clinical practice. Similarly, the novelty of the study is provided by the assessment of the effectiveness and/or rationality of the application in routine clinical conditions in the health system of the Republic of Moldova of new drugs such as bedaquiline or high-dose isoniazid, together with the identification of new predictors of the effectiveness of antituberculosis treatment and the application of more objective approaches, from a clinical point of view, in the assessment of antituberculosis treatment outcomes.

New results for science and practice: Fluorospot represents an alternative method for the diagnosis of latent tuberculosis infection with diagnostic accuracy similar to that of IGRA-EliSpot techniques; Application of deep learning algorithm-based technologies such as Fluorobot allows automated reading of microscopic smears in fluorescent staining with an accuracy comparable to that obtained at manual reading; Nationwide application of the Xpert MTB/Rif technique in the diagnosis of tuberculosis has allowed a 6-fold reduction in therapeutic delay in patients with MDR pulmonary tuberculosis; The use of bronchial aspirate specimens tested by molecular-genetic tests (Xpert MTB/Rif) in patients with pulmonary tuberculosis with highly paucibacillary sputum (microscopy and Xpert MTB/Rif negative) allows additional microbiological confirmation in a quarter of these patients; Bedaquiline used in treatment regimens in patients with MDR tuberculosis, including those with previous treatment failure, under programmatic care delivery ensures a high cure rate and reduced mortality; Resistance to isoniazid in MDR tuberculosis patients in the Republic of Moldova is overwhelmingly due to mutations in the *katG* gene (associated with high levels of minimum inhibitory concentrations against this drug), which precludes empirical administration of high doses of isoniazid (15-20 mg/kg) in treatment regimens for these patients; Restrictive pattern of pulmonary function in patients with pulmonary tuberculosis, assessed at initiation of antituberculosis treatment, is a potentially modifiable negative predictor of treatment outcome in patients with tuberculosis; Assessment of antituberculosis treatment outcome after a period of post-therapy surveillance is a more rational approach to antituberculosis treatment evaluation, feasible in conditions of programmatic care of tuberculosis patients.

Theoretical significance. The research provides the rationale for decisions on optimisation of current diagnostic algorithms on diagnosis of *M. tuberculosis* infection by potentially including serological assays to assess INF- γ and IL-2 secreted by T lymphocytes, automated reading of microscopy of fluorescent stained smears and molecular-genetic testing of bronchial aspirate specimens in patients with paucibacillary sputum. Argumentation of the mentioned interventions is done considering sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios. Similarly, the impact of the nationwide implementation of the Xpert MTB/Rif technique has been argued by assessing the overall effect on reducing therapeutic delay in patients with MDR pulmonary tuberculosis. In the evaluation of interventions for the improvement of tuberculosis treatment, was argued the effectiveness of including bedaquiline in treatment regimens under programmatic conditions in MDR tuberculosis patients by demonstrating a higher cure rate and lower mortality when using this drug, and the ineffectiveness of empirical inclusion (without assessment of genetic determinants) of high-dose isoniazid in treatment regimens in MDR tuberculosis patients. In the

same context, the rationality and feasibility of post-therapy surveillance in assessing TB treatment outcomes was argued.

Applicative value. The application of the interventions evaluated in this work allows to reduce the diagnostic delay in patients with MDR pulmonary tuberculosis, to significantly increase the microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in patients with paucibacillary sputum, and to optimize the reading of fluorescent stained smears. Likewise, the use of the evaluated therapeutic solutions has been shown to be effective in increasing cure rate and reducing mortality rate in MDR tuberculosis patients, as well as avoiding empirical use of high-dose isoniazid treatments with potential hepatotoxic effect in these patients. The use of treatment assessment after post-treatment surveillance provides have been shown to be more, from clinical point of view, for the assessment of therapeutic efficacy.

Implementation of scientific results. The theoretical and practical results of the study are used in training of medical students at the Department of Pulmonology and Allergology, as well as in the departments of "Chiril Draganiuc" Phthisiopneumology Institute. There were registered 3 certificates of innovator and 3 acts of implementation of results.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1 Medicamentele utilizate în tratamentul tuberculozei MDR.

Tabelul 2.1 Caracteristicile demografice ale subiecților cercetării.

Tabelul 2.2 Performanța IGRA-EliSpot și FluoroSpot de a diferenția tuberculoza activă, ITBL și tuberculoza vindecată.

Tabelul 3.1 Acuratețea diagnostică a examinării manuale și prin Fluorobot a frotiurilor de spută în colorație fluorescent.

Tabelul 3.2 Acuratețea diagnostică a examinării prin Fluorobot cu reevaluare manuală frotiurilor slab pozitive.

Tabelul 3.3 Concordanța dintre gradarea manuală și prin Fluorobot.

Tabelul 4.1 Dinamica implementării testării prin Xpert MTB/Rif în Republica Moldova.

Tabelul 5.1 Caracteristica cohortelor studiate, badaquilină și non-badaquilină.

Tabelul 5.2 Medicamentele incluse în schemele de tratament

Tabelul 5.3 Rezultatele tratamentului conform definițiilor OMS (2014) și TBNET în cohorta badaquilină și non badaquilină.

Tabelul 5.4 Rezultatele taratamentului confrom definițiilor OMS (2014) și TBNET în la bolnavii cu și fără de anamnestice de tuberculoză în cohora badaquilină.

Tabelul 5.5 Rezistența genotipică față de izoniazidă și rifampicină a *M. tuberculosis* cu pattern MDR în Republica Moldova apreciată prin PCR prin hibridizare liniară.

Tabelul 5.6 Rezistența genotipică față de izoniazidă și rifampicină a *M. tuberculosis* cu pattern MDR în Republica Moldova apreciată prin secvențierea de nouă generație.

Tabelul 6.1 Caracteristicile clinico-demografice și spirometrice ale lotului de studiu.

Tabelul 6.2 Caracteristicile clinico-demografice și ale funcției pulmonare la bolnavii cu rezultate negative și pozitive ale tratamentului.

Tabelul 6.3 Asocierea dintre parametrii clinici și ai funcției pulmonare cu rezultatul negativ al tratamentului la bolnavii cu tuberculoză pulmonară.

Tabelul 6.4 Definițiile categoriilor de evaluare a rezultatelor tratamentului după OMS și TBNET.

LISTA FIGURILOR

Figura 2.1 A. Vizualizarea CMSP secretoare de INF- γ în IGRA-EliSpot . B. Vizualizarea celulelor secretorii de INF și/sau IL-2 în Flurospot.

Figura 2.2 Identificarea și distribuția subiecților cercetării în cohortele analizate în baza rezultatelor culturii la *M. tuberculosis*, testului IGRA-EliSpot și amanezei.

Figura 2.3 Rezultatul testării prin IGRA-EliSpot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B).

Figura 2.4 Compararea rezultatelor IGRA-EliSpot și Fluorospot obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B).

Figura 2.5 Analiza corelațională a rezultatelor testării prin IGRA-EliSpot și Fluorospot obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B).

Figura 2.6 Concordanța dintre rezultatele testării prin IGRA-EliSpot și Fluorospot (analiza Bland-Altman) la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B).

Figura 2.7 Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10.

Figura 2.8 Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10.

Figura 2.9 Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10.

Figura 2.10 Analiza ROC a performanțelor diagnostice a aprecierii fenotipului secretor IL-2 INF- γ al limfocitelor T din sângele periferic în diferențierea bolnavilor cu tuberculoză activă de cei cu infecție tuberculoasă latentă și cei cu tuberculoză vindecată.

Figura 3.1 A. Fluorobot dispozitiv pentru examinarea automatizată a frotiurilor pentru examenul microscopic colorate fluorescent cu auramină. B. Vizualizarea frotiurilor cu diferit grad de pozitivitate în colorație fluorescent.

Figura 3.2 Identificarea și selectarea probele de spută analizate în studiu.

Figura 3.3 Acuratețea diagnostică a examinării prin Fluorobot a frotiurilor de spută în colorație fluorescentă cu auramină comparativ cu examinarea manuală de către specialiștii de laborator, cultura pe medii de cultură solidă considerată metodă de referință.

Figura 4.1 Dinamica timpului de întârziere terapeutică la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova în raport cu implementarea testării la nivel național prin Xpert MTB/RIF.

Figura 4.2 Rezultatele testelor microbiologice în aspiratul bronșic la bolnavii cu microscopie și Xpert MTB/Rif negative în sputa liber expectorată

Figura 4.3 Sensibilitatea (A) și specificitatea (B) ale microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorată.

Figura 4.4 Valoarea predictivă pozitivă (A) și valoarea predictivă negativă (B) ale microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorate.

Figura 4.5 Raportul de probabilitate pentru un test pozitiv (A) și raportul de probabilitate pentru un test negativ (B) ale microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorate.

Figura 4.6 Rata confirmării microbiologice a tuberculozei pulmonare prin evaluarea aspiratului bronșic la bolnavii cu microscopie și Xpert MTB/Rif negative în sputa.

Figura 5.1 Selectarea cohortelor de studiu.

Figura 5.2 Rezultatele tratamentului la bolnavii TB MDR cu și fără badaquilină în schema de tratament.

Figura 5.3 Citirea rezultatelor testelor LPA Hain MDR-TB plus.

Figura 5.4 Identificarea tulpinilor de *M. tuberculosis* pentru testare PCR prin hibridizare liniară.

Figura 5.5 Selectarea tulpinilor de *M. tuberculosis* pentru testare prin secvențierea de nouă generație a ADN-ului micobacterian.

Figura 6.1 Identificarea cohortei analizate de bolnavi cu tuberculoză pulmonară (TBP) cu examinarea funcției pulmonare la momentul stabilirii diagnosticului.

Figura 6.2 Rezultatul tratamentului în dependență de pattern-ul funcției pulmonare.

Figura 6.3 Rezultatele tratamentului stratificat după severitatea restricției.

Figura 6.4 Rezultatele tratamentului tuberculozei MDR în cohorta 2013-2014 în Republica Moldova apreciate după definițiile OMS (aplicate în mode curent) și definițiile simplificate TBNET (cu supraveghere post-terapie).

Figura 6.5 Rezultatele tratamentului tuberculozei MDR în cohorta 2014 în Dispensarul antituberculos nr.1 din Harkiv, Ucraina apreciate după definițiile OMS (aplicate în mod curent) și definițiile simplificate TBNET (cu supraveghere post-terapie).

LISTA ABREVIERILOR

AUC	Area Under Curve
BAAR	Bacil acido-alcooloo rezistent
BCG	Bacilul Calmette–Guérin
CFP	Celule formatoare de puncte
CFP-10	10 kDa Culture Filtrate Protein
CMI	Concentrație minima inhibitoare
CMSP	Celule mononucleare di sângele periferic
CVF	Capacitatea vitală forțată
CVI	Câmp vizual de interes
DMS	Diferența medie standardizată
DOT	Tratament sub direct observație
DPP	Derivat proteic purificat
DS	Deviația standard
ES	Eroarea standard
ESAT-6	Early Secretory Antigen Target
IC	Intervalul dintre cuartile
IFP	Institutul de fizipneumologie ”Chiril Draganiuc”
IGRA	Interferon-Gamma Release Assay
IL-2	Interleukina-2
INF-γ	Interferon- γ
ITBL	Infecția tuberculoasă latentă
LNR	Laboratorul național de referință în micobacteriologia tuberculozei
LPA	Line probe assay
LR-	Raportul de probabilitate a testului negativ
LR+	Raportul de probabilitate a testului pozitiv
MDR	Multidrog rezistență
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
NGS	Next Generation Sequencing
NTM	Micobacterii non-tuberculoase
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
OR	Raportul șanselor (Odd Ratio)
PEF	Debitul expirator de vârf

PNRT	Programul național de răspuns la tuberculoză
ROC	Receiver Operating Characteristics
RR	Riscul relativ
SIME-TB	Sistemul informațional de monitorizare și evidență a tuberculozei
SNPs	Polimorfismele nucleotidice unice
TB	tuberculoză
TBNET	Tuberculosis Network European Trials group
TCT	Testul cutanat la tuberculină
TSM	Testul de sensibilitate la medicamente
VEMS	Volumul expirator maxim în prima secundă
VPN	Volare predictivă negativă
VPP	Valoare predictivă pozitivă
WGS	Whole Genome Sequencing
XDR	Rezistență extinsă
95%Î	Intervalul de încredere de 95%

INTRODUCERE

Actualitatea temei

Tuberculoza este boala infecțioasă care anual la nivel global cauzează un important număr de îmbolnăviri și cel mai mare număr de decese provocate de un singur agent infecțios [1]. Urmare al acestui impact major asupra sănătății publice, tuberculoza este în câmpul de vedere al celor mai recunoscute instituții internaționale care stabilesc politici și prioritizează intervenții care au drept scop reducerea poverii și eventual eliminarea acestei boli [2]. În acest context în ultima decadă au fost înregistrate mai multe realizări importante atât la capitolul diagnosticului cât și a tratamentului tuberculozei.

În domeniul diagnosticul tuberculozei au fost dezvoltate o serie de teste pe bază de amplificare a acizilor nucleici care în studiile de laborator au demonstrat o înaltă acuratețe de identificare a *M. tuberculosis* combinată cu un timp redus de obținere a rezultatului [3]. Suplimentar, tehnologiile molecular-genetice au oferit posibilitatea aprecierii rapide a sensibilității la medicamentele antituberculoase esențiale. Din grupul acestor teste o implementare deosebit de largă a obținut-o testul Xpert MTB/Rif. Caracteristicile tehnice ale acestuia (acuratețea, rapiditatea și simplitatea operațională) au inspirat entuziasm chiar din primele rapoarte de implementare. Eficiența și impactul real al utilizării tehnologiei Xpert MTB/Rif în practica clinică curentă poate fi redusă de o serie de factori și poate avea un diferit grad de succes în dependență de particularitățile sistemelor medicale (rată înaltă a coinfecție TB/HIV, incidență sporită a tulpinilor multidrog rezistente, sistem centralizat de acordare a asistenței medicale etc.) [4] și categoriile de pacienți (cu forme extrapulmonare de boală, imunocompromiși, copii etc.) [5]. Astfel, determinarea impactului real al utilizării tehnologiei Xpert în diagnosticul tuberculozei în cadrul diferitor sisteme de acordare a asistenței medicale a devenit una din prioritățile de cercetare. Evaluării unor parametri ai impactului Xpert MTB/Rif asupra managementului terapeutic al bolnavilor cu tuberculoză MDR și confirmării microbiologice la bolnavii cu spută paucibacilară, în condițiile practicii clinice din Republica Moldova, sunt dedicate și două dintre obiectivele prezentei lucrări.

Odată cu implementarea în practică de noi metode diagnostice inevitabil a crescut și volumul de lucru efectuat de către laboratoarele de diagnostic microbiologic, fie urmare a efectuării directe a testărilor prin noile tehnologii, fie secundar testărilor asociate controlului calității în unitățile subordonate. În acest context și-au făcut apariția tehnologiile de efectuare și citire automatiză a metodelor clasice de diagnostic (microscopia și cultura), cu potențial de a substitui sau cel puțin de a reduce implicarea personalului uman și drept urmare "eliberarea" lui

pentru efectuarea altor testări mai complexe. În cazul unora dintre aceste sisteme automatizate, precum sistemele BACTEC pentru citirea culturilor MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), există o multitudine de date experimentale și din teren privind eficacitate și cost eficiența lor [6]. În cazul altora acuratețea și fezabilitatea aplicării în contextul diferitor scenarii de aplicare în practică încă urmează a fi stabilite. Aprecierii performanțelor platformei de citire automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă (Fluorobot) este consacrat un alt obiectiv al prezentei lucrări [7].

De rând cu realizările importante, la capitolul diagnosticului tuberculozei, au fost înregistrate și anumite dezamăgiri și speranțe neîmplinite, în special este cazul testelor de diagnostic al infecției tuberculoase latente (ITBL) [8]. Astfel, dezvoltarea pe parcursul a câtorva decenii a testelor IGRA (Interferon-Gamma Release Assay) a condus la concluzia despre specificitatea redusă a acestora în identificarea persoanelor cu ITBL cu risc sporit de progresie spre tuberculoză activă precum și în diferențierea persoanelor cu ITBL de cele cu tuberculoză activă [9]. Drept urmare, în prezent sunt desfășurate numeroase studii care urmăresc identificarea de noi biomarkeri (alternativi sau complementari INF- γ apreciat prin IGRA) care ar fi mai eficienți în diferențierea diferitor statute clinice ale infecției tuberculoase. Astfel, și unul dintre obiectivele prezentei lucrări a urmărit evaluarea potențialului rol al aprecierii profilului secretor de IL-2/INF- γ al limfocitelor T din sângele periferic în diferențierea statutelor clinice ale infecției cu *M. tuberculosis* [10].

Progresele de bază în ceea ce ține tratamentul tuberculozei sunt legate de identificarea și introducerea în practică clinică a noi medicamente și scheme terapeutice. Printre acestea cele mai sonore sunt badaquilina și delamanidul, de rând cu schemele scurte de tratament pentru tuberculoza MDR. Deși delamanidul ar putea fi, cel puțin în parte, trecut pe lista așteptărilor neîmplinite, badaquilina și-a demonstrat eficiența la toate etapele de testare clinică după care a fost inclusă în bateria de primă linie în tratamentul antituberculos [11, 12]. Cu toate acestea, există conștientizarea faptului că eficacitatea raportată în trialurile clinice ar putea să nu se regăsească în practică curentă în special în cazul tratamentului tuberculozei MDR (administrarea la bolnavi cu forme mai grave decât cei din studiu clinic, aderența mai joasă la tratamentul îndelungat, riscul mai mare al reacțiilor adverse din coadministrare cu medicația pentru comorbidități etc.). Astfel, evaluarea eficacității utilizării medicamentelor și a schemelor noi de tratament la aplicarea lor în practica clinică curentă, în special în cadrul managementului programatic al bolnavilor aplicat de către programele naționale de răspuns la tuberculoză, a constituit un interes practic major a cercetării în domeniu. În prezenta lucrare se regăsesc rezultatele evaluării eficacității includerii

badaquilinei în schemele de tratament antituberculos la bolnavii cu tuberculoză MDR în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză în Republica Moldova.

Monitorizarea și evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos reprezintă un tărâm al discuțiilor în plină desfășurare. Markerii utilizați în prezent (în mare parte microbiologici) pentru monitorizarea eficacității terapiei și stabilirii vindicării sunt indirecți și posedă o specificitate joasă [13]. Astfel, problematică cercetărilor în acest domeniu este orientată spre identificarea de biomarkeri mai specifici care ar permite stabilirea individualizată a evoluției favorabile a tratamentului și a vindecării. Rezultatele obținute în acest sens la ora actuală sunt promițătoare, dar încă care sunt departe de a fi aplicabile în practica curentă. Datorită acestui fapt există un interes viu pentru identificarea factorilor de risc pentru evoluția nefavorabilă a tratamentului și revizuirea principiilor de aplicare a criteriilor (microbiologice și clinice) utilizate pentru definirea rezultatelor tratamentului în prezent [14]. În acest context, ca parte a acestei lucrări, au fost incluse și două obiective dedicate aprecierii impactului funcției pulmonare asupra rezultatelor tratamentului antituberculos precum și evaluării fezabilității și impactului concluzionării despre rezultatele finale ale terapiei antituberculoase după monitorizarea timp de un an de la încheierea tratamentului antituberculos.

Sumarizând cele descrise mai sus conchidem pe de o parte despre pași importanți făcuți în ultima perioadă în direcția îmbunătățirii posibilităților de diagnostic și a opțiunilor terapeutice la bolnavii de tuberculoză, iar pe de alta despre existența unor provocări care impun optimizare și îmbunătățire, unele dintre care sunt discutate în prezenta lucrare.

Cuvinte cheie: TB, MDR, diagnostic de laborator, *M. tuberculosis*, tratament antituberculos

Domeniul de studiu: Pneumoftiziologie

Scopul

Evaluarea intervențiilor clinice și de laborator cu potențial de optimizare a diagnosticului și de eficientizare a tratamentului bolnavilor de tuberculoză.

Obiectivele cercetării

1. Aprecierea eficacității determinării răspunsului celular specific prin interferon- γ și interleukina-2 în diferențierea statutelor clinice ale infecției prin *M. tuberculosis*.
2. Evaluarea acurateței diagnostice a citirii automatizate a frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă prin platforma Fluorobot în diagnosticul tuberculozei pulmonare la adulți.

3. Determinarea impactului implementării tehnicii Xpert MTB/Rif asupra managementului terapeutic la bolnavii cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă în Republica Moldova.
4. Determinarea rolului evaluării specimenelor de aspirat bronșic în diagnosticul tuberculozei pulmonare la pacienții cu specimene paucibacilare ale sputei liber expectorate.
5. Aprecierea eficacității includerii badaquilinei în schemele de tratament al tuberculozei multidrog rezistente în condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză.
6. Evaluarea raționalității includerii izoniazidei în doze mari în schemele terapeutice utilizate la bolnavii cu tuberculoza multidrog rezistentă.
7. Aprecierea impactului funcției pulmonare la momentul diagnosticului asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză pulmonară.
8. Evaluarea opțiunilor de apreciere a rezultatelor tratamentului la bolnavii de tuberculoză.

Sinteza metodologiei de cercetare

Conform obiectivelor cercetării au fost selectate mai multe soluții metodologice.

Pentru obiectivul 1 a fost realizat un studiu prospectiv de apreciere a acurateței diagnostice al aprecierii profilului secretor IL-2/INF- γ a limfocitelor T din sângele periferic determinat prin platforma Fluorospot în diferențierea ITBL de tuberculoza activă (confirmată prin cultură sau test molecular-genetic) și tuberculoza vindecată în calitate de grup de control fiind utilizați persoanele sănătoase la care a fost exclusă ITBL (rezultat IGRA-EliSpot negativ).

La obiectivului 2 a fost efectuat un studiu prospectiv de apreciere a acurateței diagnostice de identificare a bacililor *M. tuberculosis* prin citirea automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu ajutorul platformei Fluorobot efectuate în scop de diagnostic al tuberculozei pulmonare. Aceasta a fost comparată cu citirea manuală a microscopiei de către personalul de laborator, ca metodă de referință fiind considerată cultura la *M. tuberculosis*. În cazul ambelor obiective (1 și 2) acuratețea diagnostică a fost apreciată prin determinarea sensibilității, specificității, valorii predictive negative (VPN), valorii predictive pozitive (VPP), raportului de probabilitatea a testului pozitiv (LR+) și raportului de probabilitate a testului negativ (LR-). La fel, pentru cuantificarea acurateței sumare în ambele cazuri a fost efectuată analiza ROC.

Pentru realizarea obiectivului 3 a fost efectuată o analiză retrospectivă de pre-/post-implementare (2011-2015) a testului Xpert MTB/Rif în Republica Moldova, pe un eșantion integral constituit din cohorta națională de bolnavi care au inițiat tratamentul pentru tuberculoza MDR în Republica Moldova în perioada de studiu, fiind analizată dinamica timpului de inițiere a tratamentului și corelarea lui cu numărul testărilor prin Xpert MTB/Rif.

În cadrul obiectivului 4 a fost efectuat un studiu retrospectiv de apreciere a acurateții diagnostice a testului Xpert MTB/Rif la testarea specimenelor de aspirat bronșic la bolnavii cu spută paucibacilară (microscopia la BAAR și Xpert MTB/Rif negative), la fel, fiind apreciată valoarea adăugată a examinării specimenelor de aspirat bronșic în confirmarea microbiologică a tuberculozei pulmonare. Similar cu primele două obiective acuratețea diagnostică a fost apreciată din perspectiva sensibilității, specificității, VPP, VPN, LR+, LR-, ca standard de referință fiind considerat cultura la *M. tuberculosis*.

Pentru obiectivul 5 a fost realizat un studiu retrospectiv de tip caz-control pentru aprecierea rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză MDR, schema de tratament a cărora a inclus bedaquilina (cohorta bedaquilină) versus cei fără de bedaquilina (cohorta non-bedaquilină). Potrivirea cohortelor după parametrii clinico-demografici și de tratament a fost efectuată în baza scorului de propensiune. Cohortele au fost comparate după tipul și rata de conversie a culturii și rezultatele finale ale tratamentului la încheierea acestuia și peste un an post-terapie.

Obiectivul 6 a fost realizat în baza unei analize retrospective de descriere a frecvenței mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă determinate cu ajutorul unei metode comerciale a testelor de hibridizare a produselor de amplificare a acizilor nucleici (Line Probe Assay - LPA, Genotype MTBDR plus ver. 1) precum și prin secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS).

Pentru obiectivul 7 a fost efectuat un studiu retrospectiv de cohortă care a comparat rezultatele tratamentului la pacienții cu tuberculoză cu funcție pulmonară normală versus cu cei cu funcția pulmonară alterată (stratificată în trei pattern-uri: obstructiv, restrictiv și mixt) determinată la momentul stabilirii diagnosticului (inițierii terapiei). Asocierea independentă dintre disfuncția pulmonară și rezultatele tratamentului antituberculos au fost evaluate în cadrul unui model de regresie logistică multiplă.

Realizarea obiectivului 8 a fost atinsă prin efectuarea unei analize descriptive a două cohorte de bolnavi cu tuberculoză, prima cohortă integrală a pacienților cu tuberculoză MDR care au inițiat tratamentul antituberculos pe parcursul la doi ani consecutivi (2013-2014) în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză din Republica Moldova și cea de a doua constituită din toți bolnavii care au inițiat tratamentul pentru tuberculoza MDR în cadrul Dispensarului antituberculos din orașul Harkiv pe parcursul anului 2014. La acestea retrospectiv au fost descrise rezultatele tratamentului aplicând două seturi de definiții, cel aplicat în mod curent (în corespundere cu recomandările OMS) și cel care presupune supravegherea post-terapeutică (definiții simplificate după TBNET), fiind evaluate potențialele avantaje ale ultimei abordări la aplicare în cadrul sistemelor de îngrijiri medicale oferite bolnavilor de tuberculoză din Europa de Est.

Sumarul capitolelor tezei

Capitolul I rezumă datele literaturii privitor la diagnosticul și tratamentul tuberculozei. În compartimentul opțiunilor diagnostice sunt descrise și caracterizate varietatea metodelor molecular-genetice de confirmare a infecției cu *M. tuberculosis*, de rând cu testele clasice precum microscopia și cultura. La fel, sunt revizuite ultimele date privitor la regimurile de tratament și medicamentele noi introduse în practica clinică pe parcursul ultimului deceniu de rând cu abordările actuale în evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos.

Capitolul II descrie acuratețea diagnostică a profilului secretor ($IL2^+/INF^-$, $IL2^+/INF^+$, $IL2^-/INF^+$) al limfocitelor T din sângele periferic în diferențierea a persoanelor cu ITBL de bolnavii de tuberculoză activă și cei cu tuberculoză vindecată în anamneză. Profilul secretor al limfocitelor T a fost apreciat prin intermediul platformei Fluorospot secundar stimulării cu antigenii micobacterieni specifici ESTA-6 și CFP-10, rezultatele fiind comparate cu acuratețea în diferențierea statutelor clinico-imunologice ale infecției tuberculoase prin IGRA-EliSpot.

Capitolul III prezintă rezultatele citirii automatizate a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă prin intermediul platformei Fluorobot (dispozitiv automatizat pe baza de *machine learning algorithm*), în speciamele de spută colectate în scop diagnostic la persoanele suspecte de tuberculoză pulmonară. Rezultatele citirii prin Fluorobot au fost comparate cu cele ale citirii de către personalul de laborator cu experiență extinsă în examenul microscopic.

Capitolul IV este dedicat potențialului de optimizare a diagnosticului tuberculozei a aplicării metodelor molecular-genetice (Xpert MTB/Rif). În special este determinată corelația dintre timpul de întârziere terapeutică și utilizarea Xpert MTB/Rif la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova, precum și valoarea adăugată a examinării prin Xpert MTB/Rif a speciamele de aspirat bronșic pentru confirmarea microbiologică a tuberculozei pulmonare cu speciame paucibacilare a sputei liber expectorate (BAAR negative, Xpert negative).

Capitolul V descrie impactul intervențiilor terapeutice precum includerea în schemele de tratament a bedaquilinei la bolnavilor cu tuberculoză MDR în condițiile managementului programatic al acestor bolnavi, în special fiind analizate impactul asupra timpului și ratei de conversie a sputei și a rezultatelor finale ale tratamentului. La fel, este determinată (ne)raționalitatea utilizării empirice (fără cunoașterea determinantei genetice a rezistenței) a dozelor mari de izoniazidă (15-20 mg/kg) la bolnavii cu tuberculoză MDR din Republica Moldova.

Capitolul VI include rezultatele aprecierii asocierii dintre disfuncția pulmonară prezentă la momentul inițierii tratamentului antituberculos și rezultatele acestuia (rata de tratament de succes, eșecul tratamentului și deces) la bolnavii cu tuberculoză pulmonară. La fel, sunt prezentate datele aprecierii rezultatelor tratamentului tuberculozei în baza criteriilor de evaluare care presupun monitorizarea post-terapeutică versus rezultatele apreciate în cadrul programelor de răspuns la tuberculoză în baza recomandărilor OMS.

Noutatea și originalitatea

Noutatea cercetării este dată de evaluarea eficacității aplicării de noi biomarkeri (profilul citokinic IL-2/INF- γ al limfocitelor din sângele periferic), specimene alternative (aspirat bronșic) și soluții tehnologice originale (FluoroSpot, Fluorobot, Xpert MTB/Rif) în scopul diagnosticării infecției tuberculoase în practica clinică. La fel, noutatea studiului este asigurată de aprecierea eficacității și/sau raționalității aplicării în condițiile clinice de rutină din cadrul sistemului de sănătate din Republica Moldova a unor medicamente noi precum badaquilina și a dozelor mari de izoniazidă, de rând cu identificarea de noi factori predictivi ai eficacității tratamentului antituberculos și aplicării unor abordări mai obiective, din punct de vedere clinic, în aprecierea rezultatelor tratamentului antituberculos.

Rezultatele obținute care au determinat soluționarea unei probleme științifice, aplicative de importanță majoră

- Fluorospot - ul reprezintă o metodă alternativă pentru diagnosticul infecției tuberculoase latente cu acuratețe diagnostică similară cu cea a tehnicilor IGRA-EliSpot.
- Aplicarea tehnologiilor pe bază de deep learning algorithm precum Fluorobotul permite citirea automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu o acuratețe comparabilă cu cea obținută la citirea manuală.
- Aplicarea la scară națională a tehnicii Xpert MTB/Rif în diagnosticul tuberculozei a permis reducerea întârzierii terapeutice de 6 ori la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR.
- Utilizarea specimenelor de aspirat bronșic testate prin teste molecular-genetice (Xpert MTB/Rif) la bolnavii cu tuberculoză pulmonară cu paucibacilaritate înaltă (microscopie și Xpert MTB/Rif negative în probele de spută liber expectorată) permite confirmarea microbiologică adițională la o pătrime dintre acești bolnavi.
- Badaquilina utilizată în schemele de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR, inclusiv la cei cu eșec a tratamentelor anterioare, în condițiile oferirii îngrijirilor medicale în mod programatic¹ asigură o rată înaltă de vindecare și reducere a mortalității.
- Rezistența față de izoniazidă la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova este în majoritatea covârșitoare a cazurilor determinată de mutații în gena katG (asociate cu niveluri înalte ale concentrațiilor minime inhibitorii față de acest medicament), fapt care exclude

¹ mod programatic – model de oferire a asistenței medicale bolnavilor de tuberculoză în cadrul unui Program național de răspuns (control) la tuberculoză, care de regulă presupune un management centralizat al resurselor diagnostice și de tratament, acest model de regulă este aplicat în țările cu incidență înaltă a tuberculozei cu venituri medii și joase.

administrarea empirică a dozelor mari de izoniazidă (15-20 mg/kg) în schemele de tratament la acești bolnavi.

- Pattern-ul restrictiv al funcției pulmonare la bolnavii cu tuberculoză pulmonară, apreciat la inițierea tratamentului antituberculos, este un factor predictiv negativ, potențial modificabil, al rezultatelor tratamentului la acești bolnavi.
- Aprecierea rezultatelor tratamentului antituberculos după o perioadă de supraveghere post-terapie reprezintă o abordare mai rațională din punct de vedere clinic în evaluarea tratamentului antituberculos, fezabilă în condițiile de îngrijire programatică a bolnavilor de tuberculoză.

Semnificația teoretică

Cercetarea oferă argumentarea teoretică necesară luării deciziilor de optimizare a algoritmilor diagnostice curente de confirmare a infecției tuberculoase prin includerea potențială în acestea a testelor serologice de apreciere a INF- γ și IL-2 secretate de limfocitele T, citirii automatizate a frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă și testării prin teste molecular-genetice a specimenelor de aspirat bronșic la bolnavii cu spută paucibacilară. Argumentarea intervențiilor menționate poate fi efectuată din perspectiva sensibilității, specificității, raportului de probabilitate pozitivă și cel de probabilitate negativă demonstrate în prezenta lucrare. La fel, a fost argumentat impactul implementării la nivel național a tehnicii Xpert MTB/Rif prin aprecierea efectului global asupra reducerii întârzierii terapeutice la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR. În cardul evaluării intervențiilor de eficientizare a tratamentului antituberculos a fost argumentată eficacitatea includerii în schemele de tratament în condiții programatice la bolnavii cu tuberculoză MDR a badaquilinei prin demonstrarea unei rate de vindecarea mai mare și a mortalități mai reduse la utilizarea acestui medicament precum și ineficacitatea includerii empirice (fără aprecierea determinatei genetice) a izoniazidei în doze mari în schemele de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR. În aceeași ordine de idei, a fost argumentată raționalitatea și fezabilitatea supravegherii postterapeutice în evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos.

Valoarea aplicativă

Aplicarea intervențiilor evaluate în cadrul lucrării permite reducerea întârzierii diagnostice la bolnavii cu tuberculoză pulmonară MDR, creșterea semnificativă a confirmării microbiologice a tuberculozei pulmonare la bolnavii cu spută paucibacilară, precum și optimizarea citirii frotiurilor de microscopie în colorație fluorescentă. Utilizarea soluțiilor terapeutice evaluate contribuie la creșterea vindecării și reducerea ratei de mortalitate la bolnavii cu tuberculoză MDR, precum și evitarea tratamentelor neargumentate cu doze mari de izoniazidă cu potențial efect

hepatotoxic la acești bolnavi. Utilizarea aprecierii eficacității tratamentului după supravegherea postratament oferă o evaluare mai obiectivă din punct de vedere clinic al eficacității terapeutice.

Implementarea rezultatelor

Rezultatele tezei au fost implementate în secțiile Institutului de fiziopneumologie "Chiril Draganiuc", respectiv fiind obținute trei acte de implementare în procesul științifico-practic și 3 certificate de inovator.

Rezultatele tezei au fost reflectate în 51 de publicații științifice inclusiv 1- monografie în monoautor editată în țară, 1 - capitol în monografie internațională, 1 - contribuție în carte de specialitate, 21 - de articole în reviste indexate în baza de date Web of Science, 1 - articol în baze de date acceptate de către ANACEC, 5 - articole în reviste din registrul național al revistelor de profil, 14 - teze, 7 - editoriale și comentarii. La fel, rezultatele tezei au fost prezentate la 19 foruri și evenimente științifice.

1. DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL TUBERCULOZEI LA ETAPA ACTUALĂ (REVISTĂ A LITERATURII)

1.1. Noțiuni și definiții

Tuberculoza este o boală infecțioasă, contagioasă cauzată de bacterii specifice din complexul *Mycobacterium tuberculosis* cu localizare predominant pulmonară, dar și în alte organe, cu o evoluție cronică, consumptivă, potențial fatală, dar care poate fi vindecată [15].

Definiția tuberculozei, expusă mai sus, enumeră reperele nosologice, etiologice și clinice care caracterizează această boală. Diversele aspecte legate de raportarea epidemiologică și managementul clinic al tuberculozei au determinat introducerea în circulație unei serii de termeni, care definesc mai multe ”tipuri” de tuberculoză. [16].

Tipuri de tuberculoză după criteriile de diagnostic al bolii

Tuberculoza confirmată bacteriologic este cazul de boală în care în cel puțin un specimen biologic obținut de la bolnav a fost confirmată infecția cu *M. tuberculosis* prin cel puțin una dintre metodele de diagnostic microbiologic precum: microscopia, cultura sau testele de diagnostic rapid aprobate de către OMS.

Tuberculoza diagnosticată clinic reprezintă cazul de boală în care nu sunt îndeplinite criteriile tuberculozei confirmate bacteriologic, dar în care medicul, sau alt lucrător medical calificat, a diagnosticat tuberculoza activă și a inițiat tratamentul antituberculos. În această categorie se includ cazurile diagnosticate în baza manifestărilor clinico-imagistice sau a semnelor histologice sugestive.

Tuberculoza prezumptivă, la fel numită și tuberculoză suspectă, descrie bolnavul care prezintă simptome și semne sugestive pentru tuberculoză.

Tipuri de tuberculoză după localizarea anatomică

Tuberculoza pulmonară se referă la oricare caz de tuberculoză confirmată bacteriologic sau diagnosticată clinic, care implică parenchimul pulmonar sau/și arborele traheo-bronșic. În acest context de menționat că cazurile de limfadenopatie intratoracică sau de pleurezie fără leziuni imagistice ale parenchimului pulmonar constituie cazuri de tuberculoză extrapulmonară.

Tuberculoză extrapulmonară se referă la cazul de tuberculoză confirmată bacteriologic sau diagnosticată clinic, care implică alte organe decât plămânul.

Tuberculoză diseminată definește afectarea a două sau mai multe organe necontigue prin răspândirea hematogenă, eventual și limfogenă, a *M. tuberculosis* [17]. La persoanele imunocompetente leziunea morfopatologică patognomonică pentru tuberculoza diseminată sunt

tuberculi granulomatoși de dimensiuni mici ("miliare", 1-3 mm). Din acest motiv termenul de tuberculoză diseminată este frecvent substituit cu cel de tuberculoză miliară. Pe de altă parte, la unii bolnavi, în special la cei imunocompromiși, leziunile miliare caracteristice tuberculozei diseminate pot lipsi, acestea fiind substituite de granuloame imature, de focare de necroză înconjurată de micobacterii și celule dendritice. În asemenea cazuri utilizarea termenului de tuberculoză miliară este irelevantă, fiind pe deplin argumentată utilizarea doar a termenului de tuberculoză diseminată [18].

La declararea îmbolnăvirilor de tuberculoză către autoritățile responsabile de evidența acestora, bolnavii care au afectări atât pulmonare, cât și extrapulmonare sunt raportate drept cazuri de tuberculoză pulmonară, inclusiv cele de tuberculoză diseminată (miliară).

Tipuri de tuberculoză după istoricul de îmbolnăvire anterioară

Pacient nou (caz nou) este bolnavul care nu a fost anterior tratat de tuberculoză sau a primit medicamente antituberculoase nu mai mult de o lună.

Pacient anterior tratat este bolnavul care în trecut a primit cel puțin o lună de tratament antituberculos. În funcție de rezultatul tratamentului în cel mai recent episod de boală sunt descrise mai multe tipuri de pacienți anterior tratați.

- *Pacient cu recidivă* (recidivă) este cazul pacientului anterior tratat care în ultimul episod de tuberculoză a fost evaluat ca și vindecat sau ca tratament încheiat. În definirea acestui tip de caz de tuberculoză nu este luat în considerație aspectul patogenetic al bolii, dacă este un caz de recidivă (reactivare) a infecției cu *M. tuberculosis* sau unul de reinfectare.

- *Pacient tratat după eșec* (retratament după eșec) este cazul pacientului anterior tratat, tratamentul căruia în ultimul episod de boală s-a încheiat cu eșec.

- *Pacient tratat după pierderea din supraveghere* (retratament după pierderea din supraveghere), este cazul pacientului anterior tratat, care în ultimul episod de boală a fost declarat ca pierdut de supraveghere.

Tipurile de tuberculoză după profilul de rezistență a M. tuberculosis

Tuberculoza monorezistentă este cazul de boală provocat de tulpini de *M. tuberculosis* rezistente față de un singur medicament antituberculos de linia întâi (izoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutolul).

Tuberculoza polirezistentă este cazul de boală provocat de tulpini de *M. tuberculosis* rezistente față de mai mult de un medicament antituberculos de linia întâi, excepție fiind rezistența concomitentă față de izoniazidă și rifampicină.

Tuberculoza cu rezistență multiplă (multidrog rezistentă, MDR) este cazul de boală provocat de tulpini de *M. tuberculosis* rezistente cel puțin față de izoniazidă și rifampicină.

Tuberculoza cu rezistență la rifampicină definește cazul de tuberculoză cu rezistență față de rifampicină confirmată prin teste de sensibilitate fenotipice sau genotipice. Cazurile de rezistență la rifampicină includ orice fel de rezistență față de rifmapicină: mono-, poli-, MDR sau XDR.

Tuberculoza cu rezistență extinsă (XDR) este cazul de boală provocat de tulpini MDR de *M. tuberculosis* cu rezistență suplimentară față de fluorochinolone și cel puțin unul dintre medicamentele incluse în grupul A de medicamente anti-MDR (badaquilina și linezolidul) [19]. Cazurile de boală cu tulpini MDR cu rezistență suplimentară față de fluorochinolone, dar sensibile față de alte medicamente din grupul A, sunt denumite pre-XDR. De menționat că până în anul 2020 tuberculoza XDR era definită prin rezistența față de fluorochinolone și aminoglicozidele injectabile de linia a doua (amicacina, kanamicina și capreomicina).

În contextul rezistenței tulpinilor de *M. tuberculosis* merită a fi menționați termenii de *rezistență primară* și *rezistență dobândită* (secundară). Primul termen definește rezistența tulpinii de *M. tuberculosis*, izolată înaintea inițierii tratamentului antituberculos, la un bolnav care nu a primit tratament antituberculos în trecut. Rezistența dobândită descrie rezistența tulpinii de *M. tuberculosis* dezvoltată în urma unui tratament antituberculos incorect. Cu unele precauții se face presupunerea că tulpina rezistentă de *M. tuberculosis* izolată de la un bolnav de tuberculoză care a primit tratament antituberculos în trecut (nu mai puțin de o lună) are rezistență dobândită [20].

1.2. Evoluția indicatorilor epidemiologici ai tuberculozei

Pe parcursul perioadelor istorice precedente numărul bolnavilor de tuberculoză a fost deosebit de mare în majoritatea țărilor lumii, inclusiv în cele cu incidență mică în prezent. Însă începând cu a doua jumătate a secolului XX, concomitent cu îmbunătățirea a condițiilor sanitare și nivelului general de trai a unor pături largi ale populației, la nivel global s-a înregistrat o reducere progresivă a incidenței tuberculozei. Din nefericire această tendință pozitivă s-a stopat în anii '80 a secolului XX, când incidența tuberculozei la nivel global a început să crească. Aceasta a fost determinat de mai mulți factori printre care apariția și răspândirea infecției HIV în unele regiuni geografice sau derapajele social-economice majore în altele. În aceste condiții la finele anilor '90 ai secolului XX și prima decadă a secolului XXI la nivel internațional, în mare parte sub egida OMS, au fost întreprinse măsuri sistematice orientate spre controlul și reducerea răspândirii acestei boli. În special este cazul strategiilor DOTS, STOP TB și END TB care sau succedat începând cu anul 1994 încoace. În rezultat, după anul 2000 a început să se observe o reducere lentă dar

progresivă a incidenței tuberculozei la nivel global. Dinamica descreșterii incidenței tuberculozei era una diferită, în țările cu incidență joasă constituind 7-10% anual în timp ce în cele cu incidență înaltă sub 2% anual. Astfel, în anul 2020 incidența estimată a tuberculozei la nivel mondial a constituit 9,9 milioane cazuri ceea ce corespunde la 127 cazuri la 100 000 populație. Cu toate acestea 30% dintre aceste cazuri rămân nediagnosticate. De menționat, că două treimi dintre toate cazurile de tuberculoză la nivel global provin doar din 8 țări cu incidență înaltă (India, China, Indonezia, Filipine, Pakistan, Nigeria, Bangladesh și Africa de Sud) [21].

Un impact, doar parțial cuantificat la etapa actuală, l-a avut asupra incidenței tuberculozei pandemia COVID-19. Astfel, în anul 2020, primul an pandemic, în marea majoritatea a țărilor lumii depistarea cazurilor de tuberculoză s-a redus dramatic, media scăderii la nivel global constituind 18% [21]. Aceasta se datorează în mare parte realocării resurselor din sistemele de sănătate, inclusiv din serviciile de diagnostic și tratament al tuberculozei, pentru lupta cu pandemia. Este de anticipat faptul că aceste cazuri nediagnosticate servesc drept surse de transmitere a tuberculozei în comunitate ceea ce va determina o foarte probabilă creștere a incidenței bolii deja în viitorul apropiat.

În perioada predecesoare utilizării antibioticilor pentru tratamentul tuberculozei rata medie a deceselor la 5 ani de la debut bolii constituia 45-50%, iar în cazurile cu microscopia sputei pozitivă - 70% [22]. Pe parcursul ultimelor decenii mortalitatea prin tuberculoză a înregistrat o reducere continuă, circa 4% anual. La etapa actuală rata deceselor la bolnavii de tuberculoză în țările cu incidență înaltă atinge valori de până la 15%, iar în țările cu incidență joasă este sub 5%. Mult mai înaltă este rata mortalității la bolnavii coinfectați cu tuberculoză și HIV (~ 30%) precum și în cazurile de tuberculoză multirezistentă (~ 25%) [21].

Rata cazurilor de tuberculoză cu rezistență la cel puțin un medicament antituberculos la nivel global constituie 11%, incluzând și cazurile de tuberculoză multirezistentă (TB MDR) cărora le revine circa 5% din numărul total de cazuri de tuberculoză. Se pare că această rată relativ joasă a multidrog rezistenței este stabilă pe parcursul anilor [21]. În același timp, numărul absolut de cazuri de tuberculoză multirezistentă, este în continuă creștere [23]. În acest context trebuie admis faptul că un număr important de cazuri de tuberculoză rezistentă la nivel global nu sunt depistate la etapa actuală, subdiagnosticarea fiind determinată inclusiv de accesul limitat la testele de diagnostic. Astfel, doar 70% dintre toți bolnavii de tuberculoză beneficiază de testare a sensibilității la rifampicină, iar rata testării pentru alte medicamente antituberculoase este și mai mică [21].

Rata cazurilor de tuberculoză MDR nu este aceeași în diferite zone ale lumii, variind între 0,5-35%. Rate cele mai mari ale tulpinilor MDR sunt observate în țările fostei Uniuni Sovietice,

inclusiv în Republica Moldova. Un alt factor cu impact asupra variabilității ratei multidrogrezistenței este expunerea la tratamente antituberculoase în trecut. Astfel, rata multidrogrezistenței este cu mult mai mică în cazurile noi de tuberculoză decât în cele cu tratament antituberculos în anamneză, respectiv 3-4% versus 18-21% [23].

Evoluția indicatorilor epidemiologici de bază în Republica Moldova pe parcursul ultimelor decenii este în mare parte similară cu cea din majoritatea țărilor membre ale fostei Uniuni Sovietice [24]. Astfel, pe fondul deteriorării situației socio-economice din perioada anilor '90 a secolului XX, s-a înregistrat creșterea progresivă a incidenței și mortalității prin tuberculoză. Valorile maxime ale acestor indicatori au fost observați în anul 2005 - incidența 133,9/100 000 locuitori și mortalitatea 19,1/100 000, comparativ cu 39/100 000 și 4,6/100 000 în anul 1990. Înregistrarea cifrelor maxime de incidență și mortalitate a fost precedată în anul 2001 de inițierea implementării strategiei DOTS, fapt care a asigurat accesul la metodele de diagnostic microbiologic și medicamentele antituberculoase, ambele practic inaccesibile în perioada anilor '90. După anul 2005 și până la declanșarea pandemiei de COVID-19, datorită implementării programelor naționale de combatere a tuberculozei, a avut loc reducerea treptată a incidenței și mortalității prin tuberculoză, în anul 2019 incidența și mortalitatea constituind respectiv 72/100.000 și 6,2/100.000. O dată cu declanșarea pandemiei COVID-19 indicatorii epidemiologici ai tuberculozei au înregistrat modificări dramatice, similar cu alte țări din regiune și din lume, dar care cu înaltă certitudine sunt "artificiale" deoarece în mare parte sunt determinate de adresabilitatea redusă și reorientarea întregului sistem de sănătate spre contracararea pandemiei. Astfel, incidența cazurilor de tuberculoză sa redus la 44/100.000 în 2020 și 51/100.000 în 2021. În același timp, mortalitatea pentru aceeași doi ani a constituit respectiv 5,2/100.000 și 4,8/100.000 populație.

Accesul limitat la medicamente, de rând cu lipsa unor măsuri adecvate de control al infecției în perioada anilor '90 au contribuit la selectarea în Republica Moldova a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis*, care au reușit ulterior să se răspândească în comunitate. Drept rezultat la ora actuală Republica Moldova înfruntă o importantă endemie de tuberculoză MDR [25]. Astfel, țara este inclusă în lista OMS a țărilor cu prioritate înaltă pentru combaterea tuberculozei MDR, având printre cele mai înalte rate ale tuberculozei MDR la nivel mondial - 29% printre cazurile noi și 52% printre cazurile de tratament (statisticile anului 2021). După cum a arătat experiența deceniilor precedente dar și estimările curente depășirea provocărilor date de tuberculoza MDR în Republica Moldova va depinde de accesul la medicamentele antituberculoase și la metodele de diagnostic rapid al tuberculozei [24].

1.3. Metode de diagnostic microbiologic al tuberculozei

1.3.1 Diagnosticul infecției tuberculoase latente

Datorită faptului că în infecția tuberculoasă latentă (ITBL) în organismul uman se află un număr extrem de mic de micobacterii aflate în stare de anabioză, metodele de diagnostic al ITBL nu urmăresc să confirme prezența agentului infecțios, dar obiectivizează indirect eventuala infecție prin aprecierea răspunsului imun celular la antigenele micobacteriene. Cel mai frecvent utilizate teste în acest scop sunt: testul cutanat la tuberculină (TCT, intradermoreacția la tuberculină, testul Mantoux), testele de eliberare a interferonului - γ (IGRA - Interferon Gamma Releasing Assay) și testele cutanate cu antigeni specifici (TCAS) [26]. Rezultatul pozitiv al oricărui test amintit poate fi obținut atât în infecția tuberculoasă latentă, cât și tuberculoza activă. Astfel, rezultatul pozitiv impune efectuarea examenelor imagistice și microbiologice necesare pentru excluderea tuberculozei active. [27].

Obiectivul de bază al diagnosticării ITBL ar fi identificarea persoanelor care necesită tratament de prevenire a tuberculozei active. Cu toate acestea aplicarea testelor diagnostice pentru ITBL, enumerate mai sus, în scop de screening sistematic la nivel populațional este puțin eficientă. Aceasta datorită variabilității semnificative a riscului dezvoltării tuberculozei în diverse categorii de persoane cu ITBL. Astfel, screening-ul ITBL este efectuat doar în grupurile cu risc sporit de progresie a ITBL în tuberculoză activă. Stabilirea acestor grupuri este o sarcină dificilă, în mare parte datorită complexității studiilor epidemiologice necesare în acest scop. Determinantele de risc major, unanim recunoscute, de progresie a ITBL în tuberculoză activă sunt statutul imun compromis și vârsta [28]. Impactul altor factori este mai puțin cert [29]. Astfel, indicațiile pentru efectuarea testelor pentru ITBL pot varia în diferite regiuni geografice datorită particularităților epidemiologice locale. [30].

Testul cutanat la tuberculină

Testul cutanat la tuberculină (TCT) este veteranul diagnosticului imunologic al ITBL, fiind aplicat în acest scop deja de peste un secol [26]. Din punct de vedere patogenetic TCT reprezintă o reacție de hipersensibilitate întârziată (tip IV). Pentru efectuarea TCT este utilizată tuberculina, un derivat proteic purificat (DPP), precipitat al filtratului culturii de *M. tuberculosis* [31]. Altfel spus, tuberculina reprezintă un mix de antigene proteice nespecifice ale *M. tuberculosis* care sunt prezente și în structura altor micobacterii, în special a *M. bovis*. Acest aspect poate determina TCT fals pozitiv în cazul expunerii persoanei la micobacterii nontuberculoase (NTM) sau la *M. bovis* în urma administrării vaccinului BCG. Cu toate acestea, după 10 ani de la vaccinare

efectul vaccinului BCG asupra TCT este unul minimal, în special, la persoanele vaccinate în pruncie [32]. Expunerea la NTM are impact asupra rezultatului TST îndeosebi în zonele cu o prevalență înaltă a micobacteriilor tuberculoase și prevalență joasă a tuberculozei.

Pentru efectuarea testului TCT, tuberculina este introdusă intradermal pe suprafața anterioară a antebrațului la nivelul treimii medii a acestuia. Rezultatul este citit după 48-72 de ore prin măsurarea indurației la locul injectării. [33]. TCT este considerat pozitiv în cazul unei indurații care depășește 10 mm în diametrul transversal în raport cu axul longitudinal al antebrațului. În același timp, la persoanele imunocompromise TCT este considerat pozitiv în cazul unei indurații de peste 5 mm. În unele țări cu incidență joasă a tuberculozei, la examinarea persoanelor care au avut contact cu bolnavii de tuberculoză, TCT este interpretat pozitiv la un diametru al indurației de cel puțin 5 mm, inclusiv la persoanele imunocompetente [34].

La citirea TCT pot fi observate fenomenele de conversie (viraj) și reversie (negativarea TST anterior pozitiv) [33, 35]. Conversia descrie apariția papulei de peste 10 mm, dar cu cel puțin 6 mm mai mare comparativ cu examinarea precedentă. Patogenetic conversia ar putea exprima fie o infectare recentă cu *M. tuberculosis* sau NTM, fie administrarea BCG. Cu toate acestea, interpretarea conversiei în context clinic este echivocă, inclusiv datorită unui eventual efect *booster* indus de doza de tuberculină administrată la testarea anterioară.

Rezultate fals negative ale TCT pot fi înregistrate la imunocompromiși, la persoanele cu subnutriție și cele cu tuberculoză activă gravă. Rezultate fals pozitive sunt descrise la persoanele vaccinate BCG sau în caz de efect booster [36]. De menționat posibilitatea unor reacții hiperergice asociate TCT precum indurații de peste 20 mm la adulți sau peste 16 mm la copii, leziuni vezicular-necrotice, limfangită și/sau limfadenită regională [33].

Printre neajunsurile TCT se mai includ subiectivitatea interpretării vizuale, precum și riscul neprezentării persoanei la vizita de citire a rezultatului (~ 10%) [34]. Cu toate acestea, datorită costurilor reduse și procedurii simple de efectuare, TCT continuă a fi pe larg utilizată în cele mai diverse zone geografice.

Testele de eliberare a interferonului- γ IGRA

IGRA sunt un grup de teste elaborate în ultimele decenii pentru aprecierea *in vitro* a interferonului- γ (INF- γ) produs de către celulele mononucleare din sângele periferic (CMSP) la stimularea cu antigene micobacteriene [36]. Pentru aceasta CMSP în sângele nativ, sau cele izolate, sunt incubate în prezența antigenelor, după care are loc cuantificarea INF- γ produs de CMSP. Majoritatea testelor IGRA, utilizate în prezent, aplică pentru stimularea CMSP două

antigene specifice ESAT-6 și CFP-10, deși pot fi folosite și antigene mai puțin specifice, inclusiv și DPP [37].

Proteinele ESAT-6 (*Early Secretory Antigen Target*) și CFP-10 (10 kDa *Culture Filtrate Protein*) sunt codificate de regiunea de diferențiere-1 (DR1) din genomul speciilor *complexului M. tuberculosis*, care este absentă la bacilul Calmette-Guerin (folosit în vaccinul BCG) și majoritatea NTM (excepție *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szlugai*, *M. riyadhense*) [38]. Astfel, prin utilizarea pentru stimularea răspunsului imun celular a antigenelor specifice (ESAT-6, CFP-10), sunt evitate rezultatele fals pozitive secundare vaccinării BCG și expunerii la NTM. Astfel, testele IGRA sunt caracterizate printr-o specificitate mai mare comparativ cu TCT, aspect care reprezintă avantajul de bază al celor dintâi [39]. Cu toate acestea, complexitatea manipulărilor de laborator asociate testelor IGRA determină costuri mai mari și un risc sporit de erori în timpul procesării în laborator.

Pentru citirea rezultatului IGRA, altfel spus a cantității de INF- γ produs de CMSP, există mai multe opțiuni tehnice, care diferă în diverse versiuni comerciale ale IGRA. Cel mai frecvent sunt utilizate reacțiile de tip ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) și EliSpot (*Enzyme-Linked Immunospot*), însă citirea rezultatelor ar putea fi efectuată și prin chimioluminescență, cromatografie în flux lateral, ELFA (*Enzyme-Linked Fluorescence Assay*) etc. [40].

Dintre testele IGRA pe bază de ELISA cele mai frecvent utilizate sunt câteva versiuni ale testului QuantiFERON (QFT) și anume: QuantiFERON Gold (QFT-G), QuantiFERON-TB Gold in tubes (QFT-GIT) și QuantiFeron-TB Gold Plus (QFT-Plus) [41]. În cazul QFT-G stimularea CMSP CD $_4^+$ cu ESAT-6 și CFP-10 are loc direct în sângele colectat într-un singur tub de testare, concomitent fiind utilizate alte două tuburi pentru controlul pozitiv și negativ al reacției. QFT-GIT utilizează suplimentar încă un antigen micobacterian (TB7.7) și comparat cu QFT-G, oferă o tehnică mai simplă de efectuare a testului. În versiunea QFT-Plus a testului antigenul TB7.7 a fost exclus, fiind adăugat un antigen specific pentru stimularea și a limfocitelor CD $_8^+$ într-un tub de testare separat. Stimularea limfocitelor CD $_8^+$ permite creșterea sensibilității testului în diferite grupuri de vârstă, inclusiv la persoanele care trăiesc cu HIV, dat fiind faptul că răspunsul CD $_8^+$ nu este afectat la această categorie de bolnavi [42].

Testul IGRA de referință pe baza reacției EliSpot este T-SPOT.TB. Acesta, la fel, utilizează antigenele ESAT-6 și CFP-10 însă cuantifică cantitatea de INF- γ prin determinarea numărului de limfocite T producătoare de INF- γ (*spot forming cells*) [43]. Studiile demonstrează o corelare excelentă dintre rezultatele obținute prin T-SPOT.TB cu cele prin QFT [44]. Cu toate acestea, utilizarea T-SPOT.TB este mult mai limitată datorită tehnicii de efectuare mai laborioase.

Similar cu TCT, rezultatele testelor IGRA pot fi influențate de mai mulți factori, cei mai importanți fiind statutul imun al persoanei testate și deficiențele procesării în laborator. Rezultatele fals negative pot fi cauzate de boli inflamatorii cronice (ex.: boala Crohn), medicația imunomodulatoare care țintește limfocitele T (ex.: leflunomid, teriflunomid), precum și tratamentele cu doze mari de glucocorticosteroizi [45–47].

Testele cutanate cu antigeni specifici

Tehnica testelor cutanate cu antigeni specifici (TCAS) este similară cu TCT, diferența fiind dată de utilizarea în locul tuberculinei (DPP) a antigenilor specifici ESAT-6 și CFP-10. Astfel, TCAS combină avantajele TCT (simplitatea efectuării și costurile reduse) și IGRA (specificitatea mai înaltă) [48]. Studiile publicate confirmă pentru TACS o specificitate comparabilă cu cea a testelor IGRA. Datele existente privitor la TACS sunt în special derivate în baza a trei variante comerciale, cel mai frecvent utilizate: C-Tb (Serum Institute of India, India); C-TST (Anhui Zhifei Longcom, China) și Diaskintest (Generium, Rusia) [37].

Biomarkeri de diferențiere a ITBL de tuberculoza activă

Din păcate, nici unul dintre testele pentru ITBL descrise mai sus nu posedă acuratețea diagnostică dorită pentru a diferenția ITBL de tuberculoza activă, precum și pentru a identifica persoanele cu risc sporit de progresie a ITBL în tuberculoză activă. În aceste condiții chiar și în grupurile cu risc sporit de progresie a ITBL în tuberculoză activă, numărul de persoane necesar de tratat pentru a preveni un caz de boală este mult prea mare decât cel dorit [49]. Acest fapt impune identificarea de noi biomarkeri care ar permite soluționarea acestor probleme.

Printre biomarkerii testați în scopul diferențierii diverselor statusuri clinice ale infecției tuberculoase întâi de toate sunt variate citokine sau combinații ale acestora. Cele mai frecvent evaluate sunt TNF- α , IP-10, IL-2, IL-10, VEGF [8]. Performanța diverselor citokine este variabilă și greu de generalizat, considerând diferențele metodologice din diferite studii [50].

Un alt grup de potențiali biomarkeri include anticorpii anti-micobacterieni, aceasta chiar dacă tradițional răspunsul imun antimicobacterian este văzut ca unul prioritar celular. Mai mulți anticorpi, luați aparte sau în combinații, împotriva la diverși antigeni micobacterieni (LAM, 38kDa, 16kDa MPT32, EspC, MPT64, Mtb81, Mt10.3, MTB8) au fost propuși pentru a diferenția ITBL de tuberculoza activă [51]. Rezultatele obținute până la moment în această direcție sunt incerte, astfel că nici unul dintre testele comerciale de acest tip nu sunt recomandate pentru aplicare clinică [52]. Cu toate acestea, cercetările în derulare ar putea modifica în viitor rolul acestor biomarkeri.

Diferențierea dintre statusurile clinice ale infecției tuberculoase ar putea fi făcută în baza markerilor (receptorilor) de suprafață ai celulelor implicate în răspunsul imun. Mai multe studii au sugerat utilitatea receptorilor CD₂₇, CD₃₈, CCR4 de pe suprafața limfocitelor T CD₄⁺. Astfel, reducerea nivelului liniilor celulare CD₂₇⁺, de rând cu creșterea celor CD₃₈⁺ și CCR4⁺, se asociază cu pierderea controlului imun asupra infecției tuberculoase [53–55]. La fel, a fost descris nivelul semnificativ mai înalt al celulelor MAIT (*mucosal associated invariant T cells*) și iNKT (*invariant natural killer T cells*) la pacienții cu tuberculoză activă și la persoanele sănătoase comparativ cu persoanele cu ITBL [56]. În același context a fost raportată o expresie redusă la persoanele cu ITBL a receptorilor PD-1 de către iNKT și celulele CD8⁺ din sângele periferic [57, 58].

Deosebit de promițătoare pentru diferențierea statusurilor clinice ale infecției tuberculoase se prezintă analiza transcriptomului uman din sângele periferic. Astfel, în ultimii 15 ani au fost descrise mai multe seturi de gene (semnături genice), care își modifică expresia la trecerea din ITBL în faza de boală activă [59]. Pioneri în acest sens sunt trei semnături genice, raportate aproximativ în aceeași perioadă, cea dintâi include 3 gene (Ras-associated GTPase 33A, lactoferrin, CD64), a doua - 9 gene (ATP5G1, ASNA1, C14orf2, KIAA2013, LY6G6D, NOLA3, RIN3, SOCS3, TEX264) și cea de a treia - 5 gene (TTLL10, RP11-358N4.3, RMRP, PPPH1, RN7SK) [60–62]. De curând au fost raportate și alte semnături cu performanțe similare [63–65]. De asemenea, au fost raportate semnături transcriptomice, care se asociază cu un risc sporit de progresare a ITBL spre tuberculoză activă [66–68]. Pe lângă genele identificate, diferențele dintre semnăturile transcriptomice amintite sunt date și de tehnicile biomoleculare de analiză a datelor genomice. Validarea pe cohorte mari de pacienți și incorporarea într-un dispozitiv diagnostic ușor de utilizat sunt pașii de parcurs până la implementarea acestui tip de biomarkeri în practica clinică.

Biomarkerii proteomici sunt într-un fel derivați din studiile transcriptomice, confirmând la nivelul proteinelor markerii genici de diferențiere a ITBL de tuberculoza activă. Odată cu dezvoltarea metodelor cu înaltă rezoluție de analiză a proteinelor (*high-resolution quantitative proteomics* și *label-free quantitative proteomics*) un număr în continuă creștere de semnături proteice au fost propuse pentru diferențierea statusurilor clinice ale infecției tuberculoase [69, 70]. Acestea au fost descrise în diverse specimene biologice precum sputa, plasma sau saliva pacienților. Similar cu semnăturile transcriptomice markerii proteomici necesită validare clinică și incorporare într-un instrument diagnostic aplicabil în practica de zi cu zi.

Markerii metabolomici pot fi examinați într-o varietate largă de specimene biologice: urină, aer expirat, sânge, spută etc. [37]. În puținele studii care au comparat profilul metabolomic la persoanele cu ITBL și boala activă, la cei din urmă a fost descris: activitatea sporită a indolamin 2,3 deoxigenazei 1 și a fosfolipazei, nivelul crescut al metaboliților adenozei precum și a acizilor

N-acetilneuraminic, chinolinic și piridoxinic [71]. Pentru dezvoltarea ulterioară a acestui grup de biomarkeri este necesară corelarea metaboliților cu eventuali markeri proteici și genomici [72].

Pentru soluționarea problemei diferențierii eficiente a ITBL de tuberculoza activă sunt evaluați nu doar biomarkeri alternativi ai răspunsului imuno-inflamator uman, dar și potențiali noi markeri micobacterieni. Una dintre astfel de abordări este detectarea prin PCR digital, sau prin tehnici pe bază de bacteriofagi, a ADN-ului micobacterian în sângele pacientului [73, 74]. La fel, pentru aprecierea răspunsului imun specific este explorată aplicarea nu doar a antigenelor codificate de regiunea DR-1 a genomului micobacterian (ESAT-6 și CFP-10) dar și a altor antigene. Un astfel de antigen cu potențial diagnostic este HBHA (*heparin-binding hemagglutinin antigen*) care a fost testat în mai multe studii la copii și adulți [75]. Un interes deosebit îl reprezintă antigenele codificate de regiuni genomice cu expresie diferită în stările de latență și de activate biologică a micobacteriei, cum ar fi antigenele: *Dormancy of survival Regulon* (DosR, inclusiv Rv0081, Rv1733, Rv1737, Rv2029c, Rv2031), *Region of Difference* (Rv2659c, Rv2660c), *Resuscitation promoting factors* (Rpfs, Rv0867c, Rv2389c), *Reactivation associated antigens* (Rv1131 and Rv3862c) și complexul *Ag85* (Ag85A, Ag85B, Ag85C) [76, 77]. Aceste antigene ar putea fi utilizate atât pentru o stimulare mai efektivă a celulelor sistemului imun ca parte a testelor ce cuantifică răspunsului imun antimicobacterian specific, cât și ar putea fi apreciate direct în speciimenele biologice ale pacientului ca și markeri ai activității microorganismului [78, 79].

1.3.2 Diagnosticul microbiologic al tuberculozei active

Diagnosticul tuberculozei active urmărește identificarea în speciimenele biologice colectate de la persoana suspectă de tuberculoză a micobacteriilor ce aparțin complexului *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) [80]. În tuberculoza pulmonară la adult speciimenu standard este sputa precum și speciimenele endobronșice (spălăturile bronșice, lavajul bronhoalveolar, aspiratul bronșic). În cazurile de tuberculoză extrapulmonară în dependență de organul afectat este necesară selectarea speciimenelor care ar oferi șansele maxime de identificare a micobacteriilor. Speciimenele colectate pot fi examinate atât prin testele clasice precum microscopia sau cultura, cât și prin metode biomoleculare rapide, fiecare dintre acestea cu performanțe și limitări care trebuie luate în considerație la selectarea unui sau altui test pentru diagnosticul tuberculozei.

Microscopia

Microscopia rămâne a fi utilizată deosebit de frecvent în diagnosticul tuberculozei și în monitorizarea eficacității tratamentului [81]. Microscopia permite cuantificarea încărcăturii bacteriene, care corelează cu gradul de contagiozitate a bolnavului, aspect important în deciziile

privitor la izolarea pacientului. Rapiditatea și costurile reduse ale metodei fac ca și în prezent aceasta să fie nelipsită atât în laboratoarele de nivel terțiar, cât și la nivelul celor mai periferice unități medicale.

Particularitățile moleculare ale peretelui celular al micobacteriilor fac posibilă vizualizarea acestor microorganisme la microscopia optică doar după colorarea prin tehnici speciale, Zhiel-Neelsen sau Kinyoun [82]. Aceste tehnici utilizează în calitate de agent colorant fucsina, astfel că în frotiul din speciemenele native micobacteriile au aspectul de cocobacili de culoare roșie, care nu se decolorează la acțiunea solvenților acizi sau alcoolului (bacili acido-alcoolo rezistenți - BAAR). În cazul examinării frotiurilor din cultura pură, micobacteriile capătă un aspect specific de cordoane serpentine.

Dezavantajul major al microscopiei optice este sensibilitatea redusă 25-82%, deși posedă o specificitate înaltă 85-99% [81, 83]. Acuratețea diagnostică a microscopiei este deosebit de redusă la persoanele care trăiesc cu HIV, la copii și în cazul speciemenelor extrapulmonare (inclusiv în exsudatul pleural). La fel, frotiul microscopic nu oferă posibilitatea de a distinge dintre micobacteriile vii și cele moarte, aspect important la utilizarea microscopiei în monitorizarea eficacității tratamentului antituberculos.

O alternativă pentru colorațiile pe bază de fucsină o reprezintă colorația fluorescente cu auramină. În acest caz cocobaciliile micobacterieni sunt vizualizați în culoare galben-oranj. Utilizarea colorației fluorescente asigură o sensibilitate diagnostică mai mare comparativ cu colorația Zhiel-Neelsen [84]. Datorită faptului că în cazul frotiurilor fluorescente este suficientă examinarea doar la ocularul cu putere optică mică, se reduce timpul de examinare. În același timp, dezavantajul nondiscriminării dintre micobacteriile vii și cele moarte se păstrează. Timp îndelungat costul înalt al microscopelor fluorescente cu iluminare pe bază de vapori de mercur a limitat semnificativ utilizarea acestui tip de microscopie. Odată cu introducerea în practică a microscopelor cu iluminare pe bază de LED (*light-emitting-diode*) examenul frotiurilor fluorescente a devenit mai accesibil din punct de vedere al costurilor și a fost implementat la scară largă în diverse regiuni geografice [85].

Utilizarea pentru colorația fluorescentă a fluoresceinei diacetat permite evidențierea în frotiul fluorescent doar a micobacteriilor vii, care prin hidroliză induc fluorescența fotocromului, bacteriile moarte ne fiind vizualizate [86]. De menționat că, metoda nu a primit o implementare largă în practica curentă.

Creșterea sensibilității examenelor microscopice poate fi obținută prin examinarea frotiurilor din sputa concentrată (decontaminată cu NaOH și centrifugată) [87]. Totuși, datorită riscurilor sporite de biosecuritate asociate centrifugării, precum și potențiala creștere a costurilor

testării, concentrarea sputei nu este recomandată pentru utilizare în practica curentă, în special în cazul cabinetelor de microscopie de la nivelul primar de asistență medicală [82].

Examinarea frotiurilor fluorescente poate fi optimizată prin implementarea citirii automatizate a imaginilor de către dispozitive pe bază de *machine-learning-algorithm* [88].

Cultura

Cultura rămâne a fi considerată standardul de referință în diagnosticul microbiologic al tuberculozei, întâi de toate datorită sensibilității înalte a metodei. Astfel, rezultatul pozitiv al culturii este obținut la o concentrație de 10-100 de micobacterii viabile într-un ml de spută, în cazul microscopiei această cifră constituie 2000-10000 BAAR/ml [82]. Însă, examenul prin cultură necesită semnificativ mai mult timp decât microscopia. În cazul specimenelor nesterile (sputa, urina), anterior procesării ulterioare, se impune decontaminarea. De obicei, în acest scop este utilizat amestecul N-acetilcisteină-NaOH. În același timp, decontaminarea excesivă poate compromite creșterea *M. tuberculosis*. În special ar putea cauza rezultate fals negative în speciemenle paucibacilare, cum sunt cele colectate de la copii [89]. În calitate de criteriu a unei aplicări raționale a procedurii de decontaminare este considerată o rată de contaminare de 3-5% din totalul culturilor procesate [82].

Cultivarea *M. tuberculosis* poate fi efectuată atât pe medii de creștere solide (Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11), cât și lichide (Middlebrook 7H9). Dintre mediile solide pe bază de ou sau agar cel mai frecvent utilizat este mediul Löwenstein-Jensen (pe bază de ou). Pentru cultivarea pe medii lichide cel mai frecvent sunt utilizate tuburile MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (BD Franklin Lakes, NJ, USA) care conțin mediu pe bază de bulion Middlebrook 7H9 [90]. Pe lângă mediul de creștere tuburile mai conțin un amestec de antibiotice (PANTA) pentru a inhiba creștere altor bacterii, atât gram pozitive, cât și negative, precum și a fungilor. La fel, la baza tubului se află un indicator impregnat într-o membrană de silicon, care devine fluorescent când concentrația oxigenului din tub scade, secundar creșterii micobacteriilor. Tuburile MGIT sunt incubate în mod automatizat în dispozitive de tipul celor BACTEC MGIT 960. Cultura în tuburile MGIT are o sensibilitate mai mare comparativ cu cultura pe medii solide. De asemenea, rezultatul este obținut semnificativ mai repede (în medie 12 zile) comparativ cu culturile pe mediu solid (în mediu 25 zile) [91]. Cu toate acestea, pentru a spori acuratețea diagnostică este recomandată cultivarea în paralel atât pe medii lichide, cât și solide. Identificarea micobacteriilor în culturile pozitive poate fi făcută prin metode moleculare (în acest caz pot fi identificate inclusiv micobacteriile nontuberculoase) sau prin teste imunocromatografice rapide bazate pe detectarea antigenilor micobacterieni.

Teste biomoleculare de diagnostic rapid al tuberculozei

Considerând limitările asociate confirmării infecției cu *M. tuberculosis* prin microscopie și cultură, domeniul tehnologiilor microbiologice de diagnosticare a tuberculozei în ultimele două decenii a urmărit elaborarea unor instrumente diagnostice care să ofere concomitent rapiditatea microscopiei și acuratețea diagnostică a culturii. În același timp, un deziderat important înaintat față de noile tehnologii se referă la oferirea unui instrument diagnostic suficient de simplu și sigur în utilizare pentru a putea fi aplicat nemijlocit la patul bolnavului (*point of care test*). Întrunirea maximală a acestor deziderate, deși nu absolută, la ziua de astăzi este materializată în câteva dispozitive diagnostice bazate pe reacția de amplificare a acizilor nucleici, precum testele Xpert, sau mai nou testele Truenat. La ora actuală OMS recomandă utilizarea acestor două tipuri de teste în calitate de teste diagnostice de primă intenție la majoritatea persoanele cu simptome sugestive pentru tuberculoză [81]. Pe lângă tehnologiile amintite nu ar trebui desconsiderate nici alte teste atât de biologie moleculară cât și imunologice introduse în practica clinică în ultima perioadă, care pot oferi un diagnostic rapid și calitativ al infecției tuberculoase. Eficiența utilizării acestor teste poate varia în dependență de particularitățile clinice sau caracteristicile epidemiologice ale infecției tuberculoase în grupul populațional în care sunt aplicate.

Xpert MTB/Rif

Xpert MTB/Rif (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) este un test diagnostic rapid pe baza reacției de polimerizare în lanț în timp real (*real-time PCR*) pe bază de cartuș. Testul este complet automatizat și oferă posibilitatea identificării *M. tuberculosis* direct în speciimenle biologice. Concomitent Xpert MTB/Rif apreciază rezistența tulpinii *M. tuberculosis* la rifampicină prin identificarea mutațiilor asociate cu rezistența în gena *rpoB* a micobacteriei [92][92]. Rezultatul oferit privitor la detecția secvențelor ADN micobacteriene este unul calitativ și poate fi: pozitiv (detectat), negativ (nedetectat) și, eventual, invalid. Acesta din urmă impune repetarea testului. Similar, rezultatul despre rezistența la rifampicină poate fi: ”rezistență detectată”, ”rezistență nedetectată” (sensibil) sau ”indeterminat”. Rezultatul ”indeterminat” trebuie interpretat în sensul imposibilității aprecierii corecte a rezistenței la rifampicină prin Xpert MTB/Rif. În această situație se impune evaluarea obligatorie a rezistenței prin teste fenotipice (cultură). Testul Xpert MTB/Rif poate fi utilizat în probe de spută și speciimenle extrapulmonare atât la adulți, cât și copii. Timpul de obținere a rezultatelor de la inițierea procesării probei este de circa două ore. Sensibilitatea cumulativă a testului în cazurile de tuberculoză pulmonară constituie 88% iar specificitatea 99% [93][93]. Totuși, sensibilitatea metodei este mult mai mică la bolnavii de tuberculoză pulmonară cu microscopie BAAR negativă, precum și la bolnavii HIV pozitivi sau la copii [94]. În

specimenele extrapulmonare sensibilitatea Xpert MTB/Rif este variabilă, fiind mai mare în aspiratele sau probele biotice din ganglionii limfatici, în lichidul cefalorahidian și aspiratul gastric [95]. În același timp, sensibilitatea în lichidul pleural este una modestă.

De la aprobarea sa de către OMS în 2010, Xpert MTB/Rif a fost pe larg implementat în marea majoritate a regiunilor lumii, inclusiv, la nivelul unităților de asistență medicală primară [96]. Datorită necesității conectării la o sursă de energie electrică, anumite dificultăți sunt întâlnite în utilizarea tehnologiei în unitățile medicale periferice în țările cu infrastructură subdezvoltată. O soluție în acest sens o prezintă Xpert Omni, un dispozitiv analog, care funcționează pe baterii reîncărcabile [97]. Implementarea Xpert MTB/Rif a permis creșterea detectării tuberculozei și reducerea întârzierii diagnostice și terapeutice în regiunile cu incidență înaltă a bolii [98]. La fel, a fost demonstrată reducerea, odată cu implementarea la scară largă a Xpert MTB/Rif, a timpului de inițiere a tratamentului pentru tuberculoza MDR în zonele cu incidență înaltă a multidrog rezistenței [99].

Xpert MTB/Rif Ultra (Xpert Ultra) este o generație nouă a testului Xpert MTB/Rif, lansată în anul 2017. Comparativ cu Xpert MTB/Rif, Xpert Ultra are o sensibilitate mai mare de detectare a *M. tuberculosis*, în mare parte datorită amplificării a două ținte adiționale în genomul micobacterian, IS6110 și IS1081 [100]. Astfel, sensibilitatea cumulativă o depășește pe cea din Xpert MTB/Rif cu 5%, iar în probele BAAR negative și cele de la bolnavii HIV pozitivi cu respectiv 17% și 13% [101]. La fel, o sensibilitate crescută a fost demonstrată la aplicarea Xpert Ultra în probele de lichid cefalo-rahidian și în speciamentele respiratorii la copii [94].

Din punct de vedere tehnic Xpert Ultra este rulat pe aceeași platformă ca și Xpert MTB/Rif, dar utilizează un cartuș cu o cameră mai mare pentru analiza ADN-ului, un regim mai rapid de amplificare și reagenți ”mai buni”. Pentru citirea rezultatelor sunt aplicate aceleași categorii ca și pentru Xpert MTB/Rif, precum și o categorie suplimentară ”urmă” (*trace*), care poate fi obținută în cazul speciemenelor paucibacilare, în care a fost înregistrată amplificarea fragmentelor IS6110 și IS1081, dar fără de amplificarea *rpoB* [102].

Sensibilitatea crescută a testului Xpert Ultra plătește tributul unei specificități mai mici comparativ cu Xpert MTB/Rif. Aceasta duce la potențiale rezultate fals pozitive la bolnavii cu istoric recent de tratament antituberculos. Astfel, rezultatul ”urmă” este suficient pentru confirmarea diagnosticului și inițierea tratamentului în cazul bolnavilor HIV pozitivi, al copiilor și în formele extrapulmonare de tuberculoză [81]. În același timp, la persoanele HIV negative după primul rezultat ”urmă” ar putea fi rezonabilă repetarea testului pe un specimen colectat *de novo*, deși nu sunt date certe pentru a recomanda o astfel de abordare [103].

Truenat MTB

Testele Truenat MTB, Truenat MTB Plus și Truenat MTB-Rif Dx (Molbio Diagnostics, Goa, India) reprezintă o alternativă financiar mai avantajoasă a testelor Xpert, produse de industria indiană [104]. Manipulările de laborator aferente efectuării testelor Truenat sunt ceva mai laborioase decât în cazul testelor Xpert, deși nu impun implicarea personalului de laborator înalt calificat, astfel fiind posibilă inclusiv aplicarea la nivelul unităților medicale periferice. Din punct de vedere tehnic Truenat sunt teste de diagnostic rapid prin micro real-time PCR, pe bază de cip. Ele sunt montate pe platforma Truelab, care oferă citirea rezultatelor peste o oră de la începutul procesării specimenelor. Cipurile Truenat MTB și Truenat MTB plus oferă identificarea *M. tuberculosis* după extragerea automatizată prealabilă a ADN-ului micobacterian din speciimenele native cu utilizarea setului Trueprep (dispozitiv și kit de reactive). Truenat MTB-Rif Dx este un cip adițional pentru identificarea consecutivă a rezistenței la rifampicină (după identificarea *M. tuberculosis* prin cipurile Truenat MTB sau Truenat MTB plus). Numărul limitat de studii disponibile la ora actuală privitor la acuratețea diagnostică a testelor Truenat arată valori ale sensibilității și specificității comparabile cu cele în cazul testelor Xpert în speciimenele de spută [105]. Acest fapt a permis recomandarea testelor Truenat (similar celor Xpert) în calitate de teste de primă intenție pentru diagnosticul microbiologic al tuberculozei pulmonare la persoanele cu simptome sugestive [81]. Performanța testelor Truenat în speciimenele extrapulmonare la ora actuală este incertă dar pare a fi promițătoare [106].

LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Testul TB-LAMP (Loopamp™ Eiken Chemical, Tokyo, Japan) este un test pe bază de amplificare rapidă a ADN-ului în condiții izotermice (~ 65C⁰). Rezultatele sunt citite în mai puțin de oră de la inițierea procesării specimenului. Testul poate fi efectuat la nivelul asistenței medicale primare, necesitând dotări de laborator minime [81]. TB-LAMP poate fi aplicat pentru înlocuirea microscopiei sau în calitate de test suplimentar în speciimenele cu microscopie BAAR negativă, având o performanță diagnostică superioară microscopiei la persoanele suspecte de tuberculoză pulmonară [107]. Acuratețea diagnostică la persoanele HIV pozitive încă nu a fost studiată.

Sisteme de diagnostic molecular genetic de înaltă capacitate

În ultima perioadă mai multe sisteme diagnostice pe bază de variate tehnici ale reacției de amplificare a acizilor nucleici care permit testarea concomitentă a unui număr mare de speciimene biologice au fost propuse pentru implementare în practica clinică. Printre acestea: RealTime MTB (Abbott Molecular, Abbott Park, USA), RealTime RIF/INH (Abbott Molecular), FluoroType MTB (Hain Lifescience, Nehren, Germany), FluoroType MTBDR (Hain Lifescience),

Cobas MTB (Roche, Rotkreuz, Switzerland), Max MDR-TB (BD, Franklin Lakes, USA) [108]. Aceste teste sunt destinate pentru utilizare în laboratoarele de nivel terțiar, iar unele dintre ele pot fi utilizate și pentru diagnosticul altor infecții cum ar fi infecția HIV sau virusul hepatitei C. Performanța testelor de înaltă capacitate în identificarea *M. tuberculosis* este similară cu cea a Xpert MTB/Rif, o parte dintre ele oferind și posibilitatea de testare a rezistenței la izoniazidă și rifampicină. Acuratețea detectării rezistenței a acestor teste este comparabilă cu cea a testelor de tip PCR-hibridizare pe membrană de nitroceluloză (*line probe assay* - LPA). Până în prezent majoritatea metodelor molecular genetice de înaltă capacitate au fost utilizate cu precădere în cadrul studiilor operaționale, în același timp, în ultimele sale recomandări OMS admite utilizarea acestor instrumente pentru diagnosticul tuberculozei pulmonare la persoanele cu simptome sugestive [109].

Testele de detectare a liparabinomanului - LF-LAM

LF-LAM (Lateral Flow - Liparabinomanan) este un test imuno-cromatografic, care permite detectarea rapidă a lipopolizaharidelor din peretele celular al micobacteriei în urină. În special, este vorba despre lipoarabinomananul (LAM) rezultat din metabolismul micobacteriilor vii sau prin distrugerea celor moarte și care este filtrat la nivel renal în urină. De regulă, pentru montarea reacției imuno-cromatografice este utilizat un sistem de flux lateral. LF-LAM are o acuratețe diagnostică redusă comparativ cu teste genetice de identificare a *M. tuberculosis*, dar comparabilă la persoanele HIV pozitive [110]. Este demonstrată creșterea sensibilității testului o dată cu reducerea nivelului de CD_4^+ . Astfel, testele LAM sunt recomandate pentru diagnosticul tuberculozei la persoanele HIV pozitive atât la adulți cât și copii care prezintă semne clinice ale bolii sau la cele asimptomatice, dar cu nivel al $CD_4^+ < 100$ celule/mm³. La ora actuală există două variante comerciale ale testului LAM: AlereLAM (AlereLAM; Abbott, Chicago, IL, USA) și FujiLAM (Fujifilm Silvamp, Japan), de către OMS fiind aprobată doar prima [111].

1.3.3 Aprecierea sensibilității la medicamente a *M. tuberculosis*

Metodele fenotipice de testare a sensibilității

Esența metodelor fenotipice de testare a sensibilității la medicamente constă în inocularea micobacteriilor izolate prin cultură într-un mediu de creștere, care conține medicamentul testat într-o concentrație cunoscută, cu observarea ulterioară a creșterii bacteriene. Lipsa creșterii corespunde sensibilității bacteriene față de medicamentul testat. Din punct de vedere tehnic metodele fenotipice sunt laborioase, durează în timp și impun menținerea unei infrastructuri și personal de laborator înalt specializate.

În practica curentă pentru testarea sensibilității față de un medicament antituberculos este utilizată concentrația critică a medicamentului (CCM). Concentrația critică se definește ca acea concentrație minimă a medicamentului care *in vitro* inhibă creșterea a 99% dintre tulpinile sălbatice de *M. tuberculosis*. Pentru fiecare dintre medicamentele antituberculoase sunt definite CCM standard, care sunt periodic revizuite. Ultima revizuire de acest tip a fost realizată în 2018 [112]. Obiectivizarea creșterii micobacteriilor poate fi directă (inspecție vizuală) precum și indirectă (ex: prin monitorizarea consumului oxigenului în mediul de creștere lichid). Identificarea corectă a complexului *M. tuberculosis*, prealabilă testării sensibilității, este crucială pentru a evita rezistențe fals pozitive. Testarea fenotipică a sensibilității/rezistenței *M. tuberculosis* față de medicamentele antituberculoase poate fi efectuată atât pe medii solide (pe bază de ou sau agar), cât și pe cele lichide [82].

În cazul mediilor solide de regulă este utilizată una dintre metodele indirecte de testare a sensibilității - metoda proporțiilor, metoda raportului de rezistență sau metoda concentrațiilor absolute. Aceste metode sunt standardizate în mare parte doar pentru medicamentele antituberculoase de linia întâi (rifampicina, izoniazida, etambutolul și pirazinamida), iar rezultatele sunt obținute după o perioadă de până la 8 săptămâni [113].

Metoda de referință pentru testarea fenotipică a rezistenței la medicamente este considerată cultura lichidă în tuburi MGIT. Această tehnică este validată pentru majoritatea medicamentelor antituberculoase și oferă rezultatele privitor la sensibilitate peste două săptămâni de la inoculare. De regulă, pentru incubarea tuburilor MGIT sunt utilizate sistemele BACTEC MGIT 960 [114].

Pe lângă culturile lichide în tuburi pentru testarea sensibilității deosebit de utilă este tehnologia ce aplică mediul de creștere lichid în godeurile plăcii de microtitrare (Sensititre MYCOTB, Thermofisher, Waltham, MA, USA) [115]. Aceasta permite de a testa mai ușor sensibilitatea concomitent față de o varietate mai mare de concentrații ale aceluiași medicament, oferind posibilitatea unei precizii crescute și astfel individualizarea rezultatelor testării fenotipice.

Complementar metodelor fenotipice descrise mai sus mai există o serie de soluții tehnice pentru o testare mai rapidă a sensibilității *M. tuberculosis* pe medii lichide cum ar fi: testul nitrat reductazei (*NRA - nitrat reductase assay*), observarea microscopică a rezistenței la medicamente (*MODS - microscopic observation susceptibility*) și indicatorul redox colorimetric (*CRI - colorimetric redox indicator*) [116].

Metode genotipice de testare a sensibilității

Metodele genotipice de apreciere a sensibilității au fost introduse pe larg în practica clinică relativ recent. Esența aprecierii genotipice a rezistenței constă în identificarea prin tehnici biomoleculare a mutațiilor specifice din genomul micobacterian asociate cu rezistența la medicamentele antituberculoase. Avantajul principal al metodelor genotipice în comparație cu cele fenotipice este rapiditatea testării cu menținerea acurateții diagnostice înalte. Totuși, substituirea completă a testării fenotipice prin metode biomoleculare în prezent nu este posibilă din considerente precum: aprecierea de către majoritatea testelor biomoleculare a rezistenței doar față de un număr limitat de medicamente, costurile relativ mari, existența unor discrepante feno/genotipice nesoluționate. Actualmente există o varietate largă de teste ce permit identificarea substratului genetic al rezistenței tulpinilor de *M. tuberculosis*. De cele mai multe ori, platformele tehnologice utilizate pentru diagnosticarea genotipică a infecției *M. tuberculosis* sunt utilizate și în scopul testării sensibilității.

Xpert MTB/Rif și Xpert Ultra

Ambele versiuni ale testului Xpert (MTB/Rif și Ultra) permit aprecierea rezistenței doar la rifampicină. În acest scop este aplicată tehnica moleculară *beacon*, deși cu unele diferențe tehnologice între cele două versiuni ale Xpert-ului. Tehnologia permite de a verifica prezența mutațiilor asociate cu rezistența în regiunea RRDR (regiunea determinantă a rezistenței la rifampicină) din gena *rpoB* a micobacteriei. Datele studiilor de laborator vorbesc în favoarea unei acuratețe diagnostice comparabile dintre Xpert MTB/Rif și Xpert Ultra. Astfel, sensibilitatea cumulativă de identificare a rezistenței la rifampicină în specișimenele pulmonare atinge 95%, iar specificitatea 98% [117]. În același timp, în cazul Xpert MTB/Rif au fost raportate unele neajunsuri precum sensibilitatea mai redusă în detectarea unor mutații specifice, sau în cazurile de heterorezistență [118]. La fel, pot avea loc rezultate fals pozitive în cazul mutațiilor sinonime, specișiminelor pulmonare paucibacilare precum și în cele extrapulmonare [119]. O parte dintre aceste neajunsuri au fost soluționate în versiunea Ultra [120].

De curând în rândul testelor pe baza platformei Xpert a fost dezvoltată versiunea Xpert XDR care permite testarea concomitentă a mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă, fluorochinolone, (moxifloxacină, ofloxacină), etambutol și aminoglicozide (amicacină, kanamicină). Xpert XDR poate examina probe de spută nativă, rezultatul fiind disponibil peste 90 de minute de la inițierea procesării. Testul examinează un set de 16 mutații cu relevanță clinică în 8 gene și regiuni promotor. În rezultat, pentru izoniazidă și fluorochinolone pot fi diferențiate mutațiile ce conferă rezistența joasă de cele asociate cu rezistență înaltă. La fel, poate fi diferențiată

rezistența încrucișată de cea izolată în cazul aminoglicozidelor. Testul are o limită de detectare a micobacteriilor comparabilă cu cea a Xpert MTB/Rif. Pentru toate medicamentele testate, cu excepția etambutolului, sensibilitatea atinge valori care variază între 94-100%, iar specificitatea 100% [121]. După cum sugerează și denumirea testului, acesta a fost conceput pentru diagnosticul rapid al tuberculozei cu rezistență extinsă (XDR), însă o dată cu revizuirea semnificației terapeutice a mai multor medicamente antituberculoase aprecierea rezistenței la aminoglicozide și-a pierdut relevanța, iar neexaminarea prin Xpert XDR a rezistenței la bedaquilină și linezolid descalifică testul în sensul capacității detectării tulpinilor XDR.

După cum a fost menționat mai sus, testele Truenat oferă posibilitatea aprecierii rezistenței la rifampicină prin aplicarea cipului MTB-Rif Dx, cu o acuratețe diagnostică comparabilă cu cea a Xpert-ului. În proces de elaborare se află o nouă versiune a Truenat care va putea determina sensibilitatea și față de unele medicamentele antituberculoase de linia a doua.

Testele PCR cu hibridizare liniară (LPA)

Pentru efectuarea testului este necesară în prealabil izolarea ADN-ului și amplificarea secvențelor de interes. Secvențele ADN amplificate sunt hibridizate cu sonde oligonucleotidice specifice complementare. Reacția de hibridizare este realizată pe bandete de nitroceluloză, pe care produsul de hibridizare poate fi citit vizual sub formă de benzi monocrome fiecare dintre care corespunde unei secvențe de amplificare [122]. Astfel LPA permite detectarea simultană a mai multor mutații de interes într-un număr mare de probe. Timpul de efectuare a testelor LPA variază între 24-48 ore. LPA poate fi efectuat pe probele de spută nativă cu microscopie BAAR pozitivă sau pe izolatele din cultură. OMS a aprobat pentru utilizare unele dintre variantele comerciale de LPA existente la moment. Două dintre acestea permit de a detecta *M. tuberculosis* și apreciază sensibilitatea față de izoniazidă și rifampicină (GenoType MTBDRplus versiunile 1 și 2 (Hain Lifescience/Bruker, Germany), Genoscolar NTM+MDRTB kit 2 (Nipro, Osaka, Japan)), iar un altul oferă și aprecierea sensibilității față de fluorochinolone și aminoglicozide (GenoType MTBDRsl versiunea 1 și 2 (Hain Lifescience/Bruker, Germany)) [123]. Acuratețea diagnostică a acestor trei teste în speciimenele cu microscopie BAAR pozitivă este similară atât pentru aprecierea sensibilității față de izoniazidă (sensibilitatea 90% și specificitatea 99%), cât și față de rifampicină (sensibilitatea 97% și specificitatea 98%) [124]. În cazul fluorochinolonei și aminoglicozidelor sensibilitatea oferită de LPA constituie 80-97% respectiv, iar specificitatea atinge 100% [117].

Recent OMS a omologat și un test LPA de origine niponă, GenoScholar PZA-TBII (Nipro, Japan), care oferă posibilitatea testării rapide a sensibilității la pirazinamidă cu o înaltă performanță diagnostică (sensibilitatea - 94% și specificitatea - 95%) [125]. Aplicarea la scară

globală este împiedicată de posibilitatea unei rate înalte de rezultate fals pozitive în zonele geografice cu incidență crescută a mutațiilor din gena *pncA*, care nu conferă rezistență față de pirazinamidă.

Sistemele de diagnostic molecular genetic de înaltă capacitate

Sistemele de diagnostic molecular genetic de înaltă capacitate amintite mai devreme, Fluorotype MTBDR (Hain Lifescience) precum și BD MAX-TB, pe lângă identificarea *M. tuberculosis* permit și testarea sensibilității la izoniazidă și la rifampicină.

Fluorotype MTBDR este un test PCR multiplex fluorescent efectuat într-un singur tub. Testul poate determina sensibilitatea față de izoniazidă și rifampicină a tulpinilor *M. tuberculosis* direct în specișenele native. Sistemul este semiautomat, concomitent fiind analizate 96 de probe. Rezultatele sunt obținute peste 3 ore de la inițierea testului, fiind interpretate automat de către *software*. Studiile de evaluare a performanței diagnostice au evidențiat o înaltă acuratețe de identificare a mutațiilor rezistente în genele de referință *katG* și *inhA* (pentru izoniazidă) și *rpoB* (pentru rifampicină) [126].

BD MAX MDR-TB este la fel un test pe bază de *real-time PCR* multiplex. Testul este complet automatizat, analizând concomitent 24 de probe de spută, oferind rezultatul peste 4 ore de la inițierea procesării. Performanțele diagnostice din studiile de laborator oferă rezultate promițătoare [127].

Secvențierea de noua generație

Secvențierea de noua generație (Next Generation Sequencing - NGS) este o metodă ce poate oferi cele mai exhaustive informații privitor la profilul de rezistență genotipică a *M. tuberculosis*. Avantajul major al NGS față de metodele clasice pe bază de cultură este timpul mult mai rapid de obținere a rezultatelor, iar față de testele biomoleculare pe bază de PCR, discutate mai sus, detectarea nu doar a mutațiilor incluse în test, dar caracterizarea completă și detaliată a întregului genom (în cazul tehnicii de Whole Genome Sequencing - WGS) sau a fragmentelor genomice de interes (în cazul la Targeted NGS - TGS) [128].

În linii mari NGS include următoarele etape tehnice: 1) extragerea ADN; 2) pregătirea bibliotecii; 3) efectuarea automatizată a NGS; 4) analiza și interpretarea datelor [102].

În procesul de analiză a datelor obținute prin NGS are loc compararea secvențelor nucleotidice ale tulpinii studiate cu cele din cataloagele de referință și identificarea polimorfismelor în genele asociate cu rezistența. Unul dintre aceste cataloage este dezvoltat și menținut de către OMS (ReSeqTB), în același timp există și alte baze de date elaborate atât la nivel instituțional cât de către diverse consorții [129]. Procesul de analiză a datelor NGS necesită

aplicarea de software specializate care sunt disponibile online atât în acces liber (TB Profiler, PhyReSE, Mykrobe, etc.) cât și în versiuni comerciale.

Capacitatea NGS de a determina rezistența tulpinilor micobacteriene nu este aceeași pentru toate medicamentele antituberculoase, fiind în mare parte condiționată de cunoașterea genelor responsabile de rezistență față de antibioticul de interes. Astfel, aprecierea rezistenței față de rifampicină, izoniazidă, fluorochinolone, aminoglicozide, etambutol și pirazinamidă la ora actuală se face cu o acuratețe înaltă, în timp ce diagnosticul rezistenței față de bedaquilină sau linezolid necesită perfectare [130].

Eforturile de implementare în practica curentă a NGS sunt orientate spre dezvoltarea unei platforme integrate, mai curând pe baza de TGS, care ar permite de a efectua într-un singur ciclu toate etapele NGS direct din speciimenele native, omițând cultivarea și izolarea prealabilă a tulpinii de *M. tuberculosis* din cultura pură. Testarea directă din speciimenele native este o provocare importantă pentru NGS, aceasta datorită conținutului prioritar (>99%) în speciimenele umane a ADN-ului non micobacterian (uman sau al altor microorganisme). Unul dintre testele comerciale disponibile pe piață, care în mare parte rezolvă aceste probleme, este Deeplex Myc-TB (Genoscreen, Lille, France) [131]. Ultimul este un dispozitiv ce efectuează secvențierea ultra profundă a 24 de regiuni de amplificare, pentru identificarea speciilor de micobacterii și aprecierea sensibilității. Tehnologia poate detecta și heterorezistența (fenomenul existenței de subgrupuri bacteriene într-o populație aparent uniformă, unele dintre care manifestă sensibilitate, iar altele rezistență față de un anumit medicament). Un alt dispozitiv similar este DeepCheck-TB (Translational Genomics Research Institute, Flagstaff, USA). Tehnologiile de secvențiere amintite în mare parte sunt instrumente pentru diagnosticul centralizat la nivelul laboratoarelor specializate de nivel terțiar cu un rulaj înalt de speciimene. În același timp, există un interes practic pentru instrumente mai mici, eventual portabile, în acest sens în proces de validare sunt MinION (Oxford Nanopore, Oxford, UK) și iSeq Illumina (San Diego, USA) [132, 133].

NGS a fost cu succes aplicată în studiile naționale de supraveghere a rezistenței în mai multe regiuni ale lumii, iar în unele țări cu incidență joasă a tuberculozei deja a substituit în totalitate testele fenotipice de apreciere a sensibilității față de medicamentele antituberculoase de linia I [134, 135]. Astfel, în viitorul previzibil este foarte probabilă implementarea pe scară largă la nivel global a NGS pentru aprecierea în mod curent a sensibilității față de toate medicamentele antituberculoase.

1.4 Principiile tratamentului farmacologic în tuberculoză

Până la mijlocul secolului XX opțiunile terapeutice în tuberculoză includeau doar tratamentele balneo-sanatoriale și tehnicile de colaborare a parenchimului pulmonar (colapsoterapie). Eficacitatea acestor tratamente era una modestă, rata de vindecare constituind 25-30% [136]. Descoperirea și introducerea în practica clinică a antibioticelor antituberculoase a deschis calea spre vindecarea majorității bolnavilor de tuberculoză [137].

Principiile generale ale tratamentului antituberculos

Deja la scurt timp după primele utilizări ale primului medicament antituberculos (streptomycină) au fost observate câteva riscuri iminente asociate tratamentului antituberculos administrat în monoterapie. În special, a fost înregistrată dezvoltarea într-un număr semnificativ de cazuri a rezistenței față de medicamentul administrat și recidivarea bolii [137]. În acest context au fost formulate două principii de bază ale tratamentului antituberculos valide și până astăzi. Primul postulează administrarea concomitentă a mai multor antibacteriene cu efect dovedit, iar cel de al doilea impune o durată îndelungată a tratamentului [138]. Explicația biologică a acestor principii reiese din coexistența în același organism a cel puțin trei subpopulații de micobacterii cu caracteristici fiziologice diferite - micobacterii cu multiplicare rapidă, micobacterii cu multiplicare lentă și micobacterii cu multiplicare sporadică [139].

Micobacteriile cu multiplicare rapidă sunt microorganisme metabolice active care constituie majoritatea populației micobacteriene din organismul bolnavului de tuberculoză. Ele se află în mediul extracelular bogat în oxigen și cu pH prielnic (6,5-7), cum este cel din perețele cavităților tuberculoase [140]. Micobacteriile cu multiplicare rapidă sunt responsabile de simptomele și contagiozitatea bolnavului. Anume acest grup de micobacterii poate dezvolta rezistență față de medicamentele antituberculoase prin apariția mutațiilor genice spontane. Frecvența cu care au loc asemenea mutații este diferită pentru diferite medicamente variind între 10^5 - 10^8 . Astfel, rezistența spontană poate apărea doar în cazul bolnavilor cu o încărcătură micobacteriană înaltă așa cum sunt cei cu leziuni cavitare și microscopie pozitivă la care se estimează un număr de 10^7 - 10^9 de micobacterii. La bolnavii cu leziuni infiltrative sau nodulare apariția mutațiilor este mai puțin probabilă datorită numărului mai redus de micobacterii din aceste leziuni (cca 10^4 - 10^6). Deoarece fiecare medicament antituberculos are o țintă de acțiune diferită în celula micobacteriană mutațiile genice, care conferă rezistență, sunt diferite pentru fiecare medicament. Probabilitatea apariției concomitente în aceeași populație a două mutații spontane diferite este dată de produsul dintre valorile probabilităților pentru fiecare medicament. Astfel,

apariția spontană concomitentă a mutațiilor care conferă rezistență față de izoniazidă și rifampicină este practic imposibilă deoarece probabilitatea apariției acestora (10^{12} - 10^{14}) depășește populația maximă de micobacterii ce poate fi atinsă în organismul uman. Astfel, polirezistență nu poate apărea drept rezultat al mutațiilor spontane. Mutațiile spontane determinate de rezistență pot fi involuntar selectate prin administrarea monoterapiei, iar tratamentul incorect la nivel populațional poate duce la selectarea tulpinilor multirezistente. În scopul prevenirii rezistenței micobacteriene tratamentul antituberculos implică administrarea concomitentă a 3-4 medicamente cu efect antituberculos confirmat [141].

Micobacteriile cu multiplicare lentă reprezintă o populație mai puțin numeroasă de microorganisme localizate în mediu intracelular hipoxemic și acid din fagolizozomi sau în focarele de inflamație din peretele cavităților. Condițiile nefavorabile determină inhibarea activității metabolice și multiplicarea lentă a acestor bacili. În același timp, metabolismul alterat reduce acțiunea medicamentelor antituberculoase. Se consideră că anume această populație de micobacterii se face responsabilă de recidivele bolii. Astfel, administrarea îndelungată a tratamentului antituberculos urmărește distrugerea micobacteriilor cu multiplicare lentă precum și a celor cu multiplicare sporadică [140–142].

Micobacteriile cu multiplicare sporadică reprezintă o populație bacteriană numeric redusă, localizată în masele cazeoase cu pH neutru. De regulă aceste microorganisme se află în stare dormantă (de anabioză) și doar sporadic se activează și se multiplică în decurs de câteva ore. Medicamentele le pot distruge doar în aceasta fază metabolic activă, care ar putea să nu aibă loc nici măcar o singură dată pe parcursul tratamentului [140–142].

Caracteristicile de bază ale medicamentelor antituberculoase

La moment pentru tratamentul tuberculozei sunt aplicate douăzeci și două de medicamente din diverse clase farmacologice și cu diferite mecanisme de acțiune. Toate aceste medicamente sunt caracterizate prin două acțiuni de bază - bactericidă și de sterilizare. Efectul bactericid caracterizează capacitatea medicamentelor antituberculoase de a distruge micobacteriile cu multiplicare rapidă, iar cel de sterilizare - capacitatea de a distruge micobacteriile cu multiplicare lentă și sporadică. Medicamentele antituberculoase cu un puternic efect bactericid sunt primordiale pentru vindecarea tuberculozei, iar un bun efect de sterilizare contribuie la reducerea duratei tratamentului.

Efectul bactericid al medicamentelor antituberculoase poate fi apreciat în baza studiilor EBA (*Early Bactericidal Activity*), a timpului de conversie a microscopiei și a ratei de conversie a microscopiei, iar efectul de sterilizare - în baza reducerii numărului de UFC (unități formatoare de

colonii) pe parcursul primei luni de tratament, timpului de conversie a sputoculturii și ratei de conversie a sputoculturii, precum și a ratei de recidivă post tratament.

Medicamentele cu cea mai pronunțată activitate bactericidă nu numai decât în ordinea descreșterii sunt izoniazida, rifampicina, fluorochinolonele (levo- și moxifloxacină), linezolidul, badaquilina, carbapenemele, delamanidul, aminglicozidele injectabile, etionamida și proteonamida (cele două din urmă mai curând au efect bacteriostatic). Din perspectiva efectului de sterilizare un eventual clasament ar fi condus de pirazinamidă și rifampicină urmate de fluorochinolone, linezolid, pretomanid, fluorochinolone și clofazimină [141, 143, 144].

Cerințele esențiale față de schemele de tratament antituberculos

În linii mari schemele de tratament antituberculos indiferent de forma clinică a bolii sau spectrul de rezistență a tulpinilor de *M. tuberculosis* trebuie să întrunească următoarele criterii: a) să includă, până la conversia bacteriologică a sputei (uneori numită faza intensivă), minim 3-5 medicamente cu acțiune antituberculoasă demonstrată prin teste de sensibilitate la medicamente; b) să includă 1-2 medicamente cu efect bactericid înalt, rolul lor fiind în asigurarea vindecării și reducerii rapide a contagiozității, importanța acestor medicamente scade după atingerea conversiei bacteriologice (faza de continuare a tratamentului); c) să includă 1-2 medicamente cu efect de sterilizare înalt, rolul lor fiind în a preveni recidivele și eventual de a reduce durata tratamentului; d) să dureze suficient de lung timp pentru a preveni recidiva bolii; e) să posedă toxicitate cât mai redusă; f) să aibă costuri cât mai mici; g) să nu interfereze cu alte medicații administrate bolnavului pentru eventualele comorbidități [142].

Considerând principiile expuse schema de tratament al fiecărui bolnav de tuberculoză ar trebui să fie personalizată reieșind din profilul de rezistență antimicrobiană a tulpinii de *M. tuberculosis* izolată de la pacientul respectiv. Aceasta ar permite evitarea tratamentelor inefficiente, care determină rezultatele nefavorabile ale terapiei și contribuie la selectarea tulpinilor rezistente. Cu toate acestea, aprecierea rapidă a rezistenței antimicrobiene frecvent nu este posibilă, fie din inaccesibilitatea sau inexistența metodelor de laborator, fie din caracterul paucibacilar al bolii. Astfel, adesea în tratamentul bolnavilor de tuberculoză sunt aplicate schemele standardizate de tratament, care pot suporta unele individualizări odată cu obținerea rezultatelor testelor de sensibilitate la medicamente. Schemele standardizate de tratament sunt diferite pentru cazurile de tuberculoză sensibilă și cea rezistentă.

Tratamentul tuberculozei cu germeni sensibili la medicamente

Schema standard de tratament recomandată în majoritatea cazurilor de tuberculoză sensibilă cu localizare atât pulmonară cât și extrapulmonară include administrarea pe parcursul a două luni a patru medicamente antituberculoase: izoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) și etambutolul (E) urmate de alte patru luni de H și R [145]. Astfel, sunt utilizate două medicamente cu efect bactericid (H, R) și două cu acțiune sterilizatoare (R, Z). Raționamentul pentru includerea E (posedă efect bacteriostatic) este de a proteja medicamentele de bază în eventualitatea rezistenței tulpinii de *M. tuberculosis* față de izoniazidă în lipsa informațiilor privitor la spectrul de rezistență. Prin urmare, în cazul cunoașterii certe a sensibilității față de H și R la momentul inițierii tratamentului antituberculos E ar putea să nu fie inclus [146].

Trecerea de la faza inițială, numită și intensivă (pe parcursul căreia se administrează HREZ), la faza de continuare (pe parcursul căreia se administrează H,R) se face la termenul de două luni de tratament în cazul obținerii conversiei microbiologice prin microscopie sau cultură. Persistența testelor microbiologice pozitive după două luni de tratament impune continuarea HREZ până la obținerea conversiei [145, 146]. Întârzierea conversiei microbiologice ar putea reflecta încărcătura bacteriană mare la începutul tratamentului precum și o concentrație suboptimală a medicamentelor [147]. Obiectivizarea concentrațiilor suboptimale poate fi realizată prin monitorizarea nivelurilor serice a medicamentelor administrate [148]. Din păcate metoda este inaccesibilă în practica curentă în majoritatea regiunilor cu incidență înaltă a tuberculozei.

De regulă, durata de patru luni a fazei de continuare este suficientă pentru a preveni recăderea bolii, însă la bolnavii cu leziuni extinse și în special la cei cu leziuni cavitare sau conversie microbiologică întârziată este rațională extinderea duratei fazei de continuare. La fel, extinderea duratei de tratament este recomandată în caz de tuberculoză a sistemului nervos central (până la 12 luni) și a celui osteo-articular (până la 9 luni) [145, 146]. Sunt împărțite părerile privitor la necesitatea extinderii fazei de continuare a tratamentului la bolnavii de tuberculoză HIV pozitiv, beneficiul cert fiind demonstrat în cazul bolnavilor care nu urmează tratament antiretroviral [149]. Extinderea duratei tratamentului antituberculos ar putea fi rațională și la bolnavii cu diabet zaharat [150].

Dozele medicamentelor utilizate la adulți sunt aceleași indiferent de forma clinică a bolii. Excepție este cazul meningitelor tuberculoase în care a fost demonstrat beneficiul administrării dozelor ridicate de rifampicină (20-30 mg/kg) [151].

La ora actuală se insistă pe administrarea zilnică a tratamentului în forme farmaceutice combinate în doze fixe per os. Formele combinate pot conține două, trei sau chiar toate patru preparate din schema de tratament. Utilizarea formelor combinate este mai curând argumentată de

comoditatea administrării și nu are impact asupra rezultatelor tratamentului [152]. De remarcat că disponibilitatea formelor medicamentoase cu doze fixe pentru copii adesea este o problemă în multe regiuni ale lumii [153]. Practică de administrare intermitentă, în câteva zile pe săptămână, se asociază cu un risc sporit de întrerupere a tratamentului motiv din care este evitată [154].

Succesul terapeutic al schemei de tratament descrise (2HREZ/4HR) poate atinge 95% cu o rată de recidivă sub 2% și o rată a reacțiilor adverse de până la 5%. Rezultatele tratamentului tuberculozei sensibile ar putea fi mai modeste în unele regiuni cu incidență înaltă a tuberculozei datorită diverșilor factori care reduc aderența bolnavului la tratament [155–157].

Una dintre intervențiile complementare tratamentului antibacterian în tuberculoza sensibilă este administrarea de glucocorticoizi (GCS). Aceștia de regulă sunt recomandați în meningita și pericardita tuberculoasă. În același timp, există date care infirmă eficacitatea GCS în pericardita tuberculoasă [158]. O altă medicație complementară este piridoxina (vitamina B6) recomandată pentru prevenirea neuropatiei periferice, descrisă în 2% dintre toate cazurile de utilizare a izoniazidei [145].

Posibilitatea reducerii duratei tratamentului în tuberculoza sensibilă, cu păstrarea ratei înalte de vindecare, este unul dintre obiectivele cercetărilor la ora actuală. În acest sens sunt evaluate scheme terapeutice care includ medicamente cu potențial de amplificare a efectului de sterilizare. Astfel, substituirea în schema clasică 2HREZ/4HR a rifampicinei cu rifapentină și a etambutolului cu moxifloxacină ar putea să permită reducerea duratei de tratament de la 6 la 4 luni [159]. În același timp, substituirea în schema clasică doar a rifampicinei cu rifapentină, cu o durată totală a tratamentului de 4 luni, duce la rezultate terapeutice inferioare. La fel, reducerea duratei tratamentului la 4 luni prin substituirea în schema clasică doar a izoniazidei sau etambutolului cu fluorochinolone (moxifloxacină sau gatifloxacină) este asociată cu un risc crescut de recidive, deși ar putea fi eficientă la bolnavii cu sarcină bacilară redusă [160]. La ora actuală se află în desfășurare studii care evaluează eficacitatea în tuberculoza sensibilă a schemelor de tratament cu o durată redusă care includ pretomanidul și/sau badaquilina sau doze mari de rifampicină [161–163].

Tratamentul tuberculozei cu germeni cu rezistență multiplă sau rezistență extinsă la medicamente

Tradițional tratamentul tuberculozei MDR era caracterizat printr-o durată îndelungată (18-24 luni), număr mare de medicamente administrate, toxicitate sporită și rată modestă a succesului terapeutic (50-60%) [11, 21]. Timp îndelungat una dintre cauzele de bază a acestor neajunsuri a fost lipsa antibacterienelor cu acțiune bactericidă și sterilizatoare similară cu cea a izoniazidei și rifampicinei, față de ultimele tulpinile micobacteriene MDR fiind rezistente. În

prezent există mult optimism privitor la creșterea succesului terapeutic cât și reducerii duratei tratamentului în tuberculoza MDR. Acesta este generat inclusiv de identificarea și implementarea în practica clinică a medicamentelor antituberculoase noi (badaquilina, pretomanidul, delamanidul), confirmarea efectului antituberculos pentru unele antibacteriene mai vechi (linezolidul) și identificarea de combinații terapeutice noi dintre aceste medicamente. Astfel, utilizarea în tratamentul tuberculozei MDR a antibioticilor precum badaquilina a permis îmbunătățirea semnificativă a rezultatelor tratamentului antituberculos atât în studiile randomizate cât și în practica clinică [164–166].

Rezultatele unor studii clinice din ultima perioadă (NixTB, Zenix, TBPRACTECAL) au determinat ca, în prezent, recomandarea de bază pentru tratamentul tuberculozei MDR să fie schema scurtă care include badaquilina, pretomanidul și linezolidul (BPaL), eventual complementate cu moxifloxacină (BPaLM) [167, 168]. Durata tratamentului în acest caz este redus la doar 6 luni. Schema este recomandată pentru toți bolnavii adulți (≥ 15 ani) cu tuberculoză MDR precum și pentru cei cu rezistență preXDR. Neadministrarea anterioară a acestor medicamente pentru o durată mai mare de o lună este o condiție de eligibilitate a bolnavului. Pentru a decide privitor la posibilitatea includerii moxifloxacinei anterior inițierii schemelor BPaL este binevenită testarea sensibilității față de fluorochinolone printr-o metodă moleculară rapidă. Imposibilitatea excluderii prin aplicarea metodelor moleculare rapide a rezistenței și față de alte medicamente din schema de tratament impune administrarea empirică a acestora. În aceste condiții sunt rezonabile îngrijorările privitor la multiplicarea rezistenței secundar aplicării empirice a acestei scheme standard în zonele geografice unde tulpinile MDR se caracterizează prin rezistență adițională inclusiv la bedaquilina și linezolid [169, 170].

Alternativ schemelor BPaL poate fi utilizată o altă schemă standard ce include pe parcursul primelor 4-6 luni Bdq, Lfx /Mfx, Eth, E, Z, Clf și H (doze mari), urmate de 5 luni de Lfx /Mfx, Clf, E, Z [11, 167]. Istoric schema a fost cunoscută ca schema ”mai scurtă” sau schema Bangladesh, care inițial în loc de badaquilina conținea o aminoglicozidă injectabilă, iar fluorochinolona de elecție era gatifloxacină [171]. În baza studiilor ulterioare preparatul injectabil a fost substituit cu badaquilina, iar levo- sau moxifloxacină au înlocuit gatifloxacină. La fel, etionamida ar putea fi substituită cu linezolid administrat pentru o durată de două luni [172, 173]. Condițiile de eligibilitate includ lipsa expunerii anterioare față de medicamentele incluse în schemă, precum și excluderea prealabilă a rezistenței la fluorochinolone. Similar cu schemele BPaL trebuie comentat riscul sporit de selectare a tulpinilor rezistente asociat tratamentului empiric cu aceste scheme în zonele cu rezistență adițională a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis*. [174, 175].

Pacienții neeligibili pentru schemele scurte de tratament ar trebui să urmeze un tratament individualizat, ajustat conform profilului de rezistență la medicamente. În acest caz schema trebuie să includă cel puțin 4 medicamente antituberculoase până la atingerea conversiei sputei. Includerea a cel puțin 5 medicamente antituberculoase, la fel, pare a fi o opțiune rezonabilă [176]. La selectarea medicamentelor ce urmează a fi incluse în schema de tratament se dă prioritate preparatelor din grupul A al medicamentelor anti MDR, urmate de cele din grupul B și C (**Tabelul 1.1**) [11]. Durata totală a tratamentului cu o astfel de schemă constituie 18 luni. Durata îndelungată a medicației reprezintă dezavantajul major al abordării individualizate în selectarea schemei de tratament al tuberculozei MDR, în special în lumina datelor privitor la obținerea vindecării cu schemele BPaL administrate timp de 6 luni. Durata îndelungată este condiționată de lipsa unui marker fidel care ar obiectiviza ”sterilizarea” focarului de infecție și ar exclude riscul de recidivă a bolii. Identificarea unor astfel de markeri ar permite individualizarea nu doar a spectrului de medicamente prescrise dar și a duratei tratamentului.

Tabelul 1.1 Medicamentele utilizate în tratamentul tuberculozei MDR [177]

	Medicamentul
Grupul A se includ toate trei medicamente	- levofloxacină sau moxifloxacină - bedaquilina - linezolid
Grupul B se include unul sau ambele medicamente	- clofazimina - cicloserina sau terezidona
Grupul C sunt selectate când medicamentele din grupurile A și B nu sunt suficiente pentru a forma schema de tratament	- etambutol - delamanid - pirazinamida - imepinem/cilastatină sau meropenem - amikacina sau streptomicina - etionamida sau proteonamida - acidul para-amino salicilic

Tratamentul chirurgical

Aplicarea în a doua jumătate a secolului XX a antibioticelor antituberculoase a redus dramatic rolul chirurgiei în tratamentul acestei boli, vindecarea prin tratament farmacologic fiind posibilă la majoritatea bolnavilor. Astfel, timp îndelungat, chirurgia a fost rezervată fie rezolvării unor complicații acute cu risc vital fie menajării sechelelor posttuberculoase avansate. Interesul față de intervențiile chirurgicale, ca metodă de tratament al tuberculozei, a revenit odată cu amplificarea numărului de cazuri de tuberculoză MDR [178]. Metaanalizele efectuate în baza cohortelor de bolnavi selectați cu tuberculoză MDR demonstrează creșterea importantă a șanselor de vindecare la complementarea tratamentului farmacologic cu cel chirurgical (OR 2,62; 95%ÎÎ, 1,94-3,54) [179]. În același timp, la interpretarea acestor date trebuie de ținut cont de comparabilitatea doar parțială a bolnavilor de tuberculoză supuși tratamentului chirurgical versus cei tratați doar farmacologic, cei din urmă ar putea fi noneligibili pentru chirurgie datorită unei boli prea avansate. Tot în acest context trebuie reamintit faptul că aceste rezultate au fost generate până la introducerea în practică a noilor medicamente antituberculoase. Decizia privitor la oportunitatea tratamentului chirurgical trebuie să fie luată individualizat în cadrul consiliilor multidisciplinare [180]. Timpul optim pentru intervenție este decis din perspectiva evoluției clinice a bolii. În varianta ideală, intervenția chirurgicală ar trebui efectuată după obținerea conversiei microbiologice a sputei, însă, în condițiile când aceasta nu este posibil și în lipsa indicațiilor vitale, o perioadă premergătoare de circa 3 luni de tratament antibacterian este recomandată. Intervențiile cele mai frecvente sunt rezecțiile anatomice și pulmonectomiile. Toracoplastia poate fi o opțiune când rezecția pulmonară este contraindicată. Chirurgia minim invazivă, inclusiv cea robotic asistată, poate ameliora semnificativ evoluția postoperatorie a pacienților [181].

1.5 Monitorizarea și evaluarea tratamentului antituberculos

Considerând durata îndelungată și într-un anumit sens complexitatea terapiei antituberculoase, monitorizarea pe parcursul întregului tratament a eficacității medicației de rând cu observarea aderenței pacientului și identificarea eventualelor reacții adverse sunt elemente indispensabile managementului clinic al bolnavilor de tuberculoză. Monitorizarea tratamentului antituberculos se efectuează în baza mai multor parametri microbiologici, clinici, biologici și eventual farmacologici.

Monitorizarea microbiologică

Monitorizarea microbiologică include examinarea sistematică prin microscopie și/sau cultura la *M. tuberculosis*. Rezultatele acestor teste sunt utilizate în calitate de marker primar, deși

surogat, al eficacității tratamentului antituberculos, iar înregistrarea conversiei microbiologice este criteriul de referință pentru decizia privitor la vindecarea bolnavului [182]. Conversia microbiologică definește situația în care la un bolnav cu tuberculoză confirmată bacteriologic au fost obținute consecutiv două culturi negative (sau microscopii - conversie microscopică) la un interval de cel puțin 7 zile dintre cele două examinări [183]. De regulă vindecarea este asumată la atingerea conversiei în tuberculoza sensibilă nu mai târziu de luna a 2-3, iar în cea MDR nu mai târziu de luna a 6-8 de la inițierea tratamentului. Atingerea conversiei nu semnifică și finalizarea tratamentului, acesta este prelungit pentru o durată de timp standard, stabilită în mod empiric, diferită în tuberculoza sensibilă și cea MDR. Prolungirea empirică a tratamentului este motivată de imposibilitatea concluzionării despre sterilizarea focarului de infecție doar în baza dispariției micobacteriilor din speciunile biologice analizate, iar biomarkeri alternativi, mai sensibili, la ora actuală nu există.

Frecvența examinărilor microbiologice este în mare parte condiționată de capacitățile de testare a instituției medicale sau, în cazul țărilor cu incidență crescută a tuberculozei, de cele ale programului național de combatere a tuberculozei. În cazul tuberculozei sensibile o examinare prin microscopie (sau cultură) la 2 luni urmată de alte două la 5 și 6 luni de la inițierea tratamentului constituie minimul recomandat. Rezultatul pozitiv al testărilor microbiologice la oricare dintre aceste termene trebuie să ridice suspiciuni privitor la rezistența microbiană, neaderența bolnavului sau concentrațiile serice suboptimale a medicamentelor administrate. În cazul tuberculozei rezistente la medicamente, în special în cazurile MDR, frecvența examinărilor microbiologice este cel puțin lunară, fiind considerate în special rezultatele culturii [11, 138]. În centrele cu resurse suficiente examinările microbiologice de monitorizare până la atingerea conversiei culturii frecvent sunt efectuate săptămânal [176]. În acest caz drept marker complementar al eficacității tratamentului poate fi utilizat timpul de pozitivare a culturii, creșterea acestuia reflectă reducerea încărcăturii micobacteriene și respectiv eficacitatea terapiei.

Examinările microbiologice de după încheierea tratamentului sunt orientate spre depistarea precoce a cazurilor de recidivă a bolii. Un consens în ceea ce privește durata optimală și frecvența examinărilor nu există, un număr minimal de examinări ar include microscopia și cultura la termenul de 6 și 12 luni de la încheierea tratamentului, dar și acestea ar putea fi greu de asigurat în multe dintre regiunile cu resurse limitate și incidență înaltă a tuberculozei [184].

Teste moleculare bazate pe identificarea ADN-ului micobacterian nu sunt recomandate pentru monitorizarea tratamentului, datorită posibilității izolării timp îndelungat, chiar după vindecare, a ADN-ului din micobacteriile moarte [185].

Monitorizarea clinico-biologică și supravegherea efectelor adverse

Independent de forma clinică și patternul de rezistență a micobacteriei spectrul examinărilor clinico-biologice aplicate pentru monitorizarea tratamentului antituberculos ar trebui să includă aprecierea simptomelor, parametrilor vitali, masei corporale, precum și a altor date ale examenului fizic, radiologic și de laborator. De menționat că dacă parametrii examenului fizic și a celui imagistic sunt într-o anumită măsură, deși în una mai mică decât testele microbiologice, utilizate în mod curent la aprecierea eficacității tratamentului, atunci testele de laborator de regulă sunt efectuate pentru documentarea posibilelor reacții adverse asociate tratamentului antituberculos. Frecvența examinărilor și lista desfășurată de teste efectuate este condiționată de severitatea bolii, devierile inițiale, simptomele apărute pe parcursul tratamentului, dar și de disponibilitatea resurselor din sistemul medical. De regulă o vigilență sporită este necesară în cazul bolnavilor cu factori de risc sporit de evoluție nefavorabilă a bolii precum: vârstnicii, cazurile de tuberculoză rezistentă, copii sub 5 ani, persoanele care trăiesc cu HIV precum și cele cu alte boli cronice (cardiace, hepatice, renale, diabet zaharat sau malnutriție), leziuni cavitare importante sau funcție pulmonară afectată [80, 186].

În cazurile tipice de tuberculoză la adulții care nu au comorbidități severe și tolerează bine tratamentul frecvența vizitelor de monitorizare la medic și a examinărilor paraclinice (imagistice și de laborator) de regulă este adaptată la frecvența testelor de supraveghere microbiologică descrise mai sus. Examinările imagistice de monitorizare la bolnavii cu tuberculoză pulmonară de regulă includ radiografia toracică. Examinări imagistice prin CT sau RMN sunt indicate pacienților cu afectări extrapulmonare sau la cei cu boală pulmonară severă sau evoluție nefavorabilă. Ultrasonografia toracică este de preferat pentru monitorizarea imagistică a epanșamentelor pleurale sau cardiace. Spectrul testelor de laborator poate include, hemograma, teste serologice de apreciere a funcției renale și hepatice precum și glicemia sau ionograma. Însă, de regulă, examinările biochimice amintite sunt efectuate doar la pacienții simptomatici sau la cei cu devieri la momentul inițierii tratamentului. Când schema de tratament include medicamente care pot determina efecte adverse specifice, monitorizarea paraclinică ar putea include examenul ECG, electromiografia, audiograma, sau examenul oftalmoscopic [187]. De regulă efectuarea acestor examinări are loc doar la momentul suspectării clinice a efectului advers respectiv, aceasta datorită accesibilității limitate în multe dintre regiunile cu incidență înaltă a tuberculozei.

Monitorizarea reacțiilor adverse la medicamente impune o vigilență sporită din partea tuturor persoanelor implicate în îngrijirile oferite bolnavilor de tuberculoză. Deosebit de frecvent reacțiile adverse sunt asociate tratamentului tuberculozei MDR. Reacțiile adverse trebuie căutate activ de lucrătorii medicali atât în timpul vizitelor de monitorizare cât și în timpul oferirii zilnice

a medicamentelor. La fel, pacientul trebuie instruit în a urmări și a informa lucrătorii medicali despre oricare reacție potențial apărută secundar administrării medicamentelor [188].

Monitorizarea aderenței la tratament

Durata îndelungată a tratamentului antituberculos inevitabil sporește riscul de întrerupere a terapiei. Există o acceptare largă a faptului că una dintre cele mai efective intervenții pentru asigurarea aderenței la tratamentul antituberculos este administrarea acestuia sub observare directă (*Directly Observed Treatment* - DOT) din partea unei persoane instruite în acest scop. Aceasta din urmă poate fi un lucrător medical sau un membru din comunitate sau familie care oferă zilnic bolnavului de tuberculoză medicamentele necesare și se asigură despre ingerarea lor de către pacient [189]. DOT poate fi oferit în cadrul instituțiilor medicale de ambulatoriu, caz în care bolnavul se deplasează zilnic la instituția respectivă. Alternativ DOT este oferit la domiciliul bolnavului, unde este zilnic vizitat de persoana responsabilă de asigurarea DOT. Se pare că în ultimul caz intervenția este mai bine acceptată de către bolnavi. Pe lângă aplicarea DOT a fost demonstrat rolul și al altor intervenții în menținerea aderenței la tratamentul antituberculos printre acestea reamintirea despre necesitatea administrării medicației prin mesaje SMS, utilizarea cutiilor de medicamente cu memento-uri, oferirea de stimulente financiare și consilierea continuă a bolnavilor. [190]. O tendință din ultima perioadă este de a substitui DOT clasic prin observarea videoasistată a administrării medicamentelor (VOT). Eficacitatea acestei metode pare a fi similară cu DOT fiind depășită inconveniența deplasării zilnice la instituția medicală sau domiciliul pacientului [191].

Monitorizarea nivelului seric al medicamentelor

Raționamentul monitorizării nivelului seric al medicamentelor (MSM) la bolnavii de tuberculoză pornește de la premisa că expunerea micobacteriilor la concentrații suboptimale de medicament determină dezvoltarea rezistenței și duce la eșecul terapiei.

Eficacitatea *in vivo* a medicamentului corelează cu atingerea valorilor critice în sângele bolnavului a unor indicatori farmacocinetici precum AUC_{0-24}/MIC , C_{max}/MIC și T/MIC . Măsurarea acestor indicatori în cadrul studiilor de MSM permite obiectivizarea subexpunerii la medicament, corelarea cu datele sensibilității fenotipice și genotipice ale micobacteriei, urmată de eventuale ajustări ale dozelor de medicament administrat [192].

Indicațiile generale pentru MSM în tuberculoză ar include bolnavii cu comorbidități sau comedicație care pot altera farmacocinetica medicamentelor antituberculoase. De regulă, aceasta este cazul bolnavilor de tuberculoză cu malabsorbție gravă, diabet zaharat, HIV sau insuficiență

renală. La fel, MSM este binevenită în cazurile de lipsă a eficacității terapeutice în condițiile unei aderențe bune a bolnavului. Unii autori subliniază importanța MSM în tratamentul tuberculozei MDR în cazul utilizării linezolidului, fluorochinolonelor, aminoglicozidelor sau cicloserinei [176].

Din punct de vedere al implementării practice, efectuarea MSM necesită tehnologii de laborator precum HPLC-UV (*high-performance liquid chromatography-UV detection*) și LC-MS/MS (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Din păcate acestea sunt accesibile, chiar și în țările cu venituri înalte, doar într-un număr limitat de centre clinice sau de cercetare [193]. La fel, MSM necesită colectarea și testarea a multiple probe de sânge, fapt care determină un grad adițional de laboriozitate. Implementarea metodelor bazate pe colectarea doar a 2-3 probe post-expunere la medicament are potențialul de a simplifica aplicarea în practică a MSM. La ora actuală aceste metode sunt standardizate doar pentru medicamentele antituberculoase de linia întâi și unele medicamente pentru tratamentul MDR (linezolidul, fluorochinolonele) [194]. Odată cu apariția posibilității de a utiliza un număr redus de specimene, aplicarea tehnicilor de analiză a probelor de sânge uscat (*dry blood spots*), care facilitează transportarea către laboratoare dotate cu HPLC, am putea asista la o implementare mai largă a MSM inclusiv în centrele medicale cu resurse limitate [195].

Evaluarea rezultatelor finale ale tratamentului antituberculos

La ora actuală datorită eforturilor OMS în majoritatea țărilor lumii rezultatele tratamentului tuberculozei sunt apreciate în baza aceluiași set standardizat de definiții. Acestea permit o evaluare unificată a rezultatelor tratamentului la nivel local și compararea lor cu cele din alte regiuni. Ultima versiune a acestor definiții a fost publicată de către OMS în 2021 [196]. Ele definesc șapte categorii de bază și una opțională ale rezultatelor terapiei antituberculoase și sunt aplicabile atât în tuberculoza sensibilă cât și cea rezistentă.

Categoriile de bază includ noțiunile de: eșec terapeutic, vindecat, tratament încheiat, decedat, pierdut din supraveghere, neevaluat și succesul tratamentului. Ultima dintre categoriile enumerate este una cumulativă însumând cazurile vindecate și cele care au încheiat tratamentul. Pentru definirea acestor categorii sunt considerate statutul microbiologic al pacientului la finalizarea/oprirea tratamentului și gradul de aderență al acestuia la terapie. Categoriile de bază sunt recomandate pentru evaluarea curentă a rezultatelor tratamentului în cadrul programelor de control al tuberculozei și de fapt au drept scop evaluarea eficacității programului și a intervențiilor efectuate în cadrul acestuia, chiar cu riscul de a subevalua unele aspecte clinice ale bolii [197].

Categoria opțională de evaluare a rezultatelor tratamentului oferă o definiție alternativă a cazului vindecat. Pentru aceasta este evaluat statutul bolnavului nu doar la finalizarea

tratamentului, dar și pe parcursul unui an după încheierea terapiei. În special este verificată lipsa recăderii bolii sau a decesului post-tratament. În recomandările curente ale OMS, categoria opțională este recomandată de a fi aplicată doar în studiile operaționale și nu în evaluarea curentă. În același timp, anume lipsa recăderii bolii este utilizată drept criteriu de eficacitate în studiile clinice ale medicamentelor și a schemelor terapeutice noi.

TBNET (Rețeaua europeană de promovare a cercetării în domeniul tuberculozei), în baza evaluării unei cohorte clinice multinaționale de bolnavi de tuberculoză, a argumentat utilitatea pentru practica clinică a aplicării supravegherii post-terapie [198]. Aceasta deoarece din perspectivă clinică lipsa recăderii în perioada postterapie oferă un argument suplimentar privitor la sterilizarea focarului de infecție, fapt despre care pe parcursul tratamentului se conchide doar indirect în bază lipsei micobacteriilor în speciunile supuse examinărilor microbiologice. Astfel, că o recădere în perioada imediat următoare încheierii tratamentului de fapt obiectivizează infecția "restantă" și previne concluzia greșită privitor la vindecare. Desigur că nu ar trebui exclusă nici posibilitatea reinfectării după încheierea tratamentului, deși mai curând că în majoritatea cazurilor este vorba despre reactivare și nu reinfecție [199]. Unul dintre argumentele de bază împotriva adoptării în calitate de criteriu de vindecare a rezultatelor supravegherii postterapeutice este lipsa capacităților logistice de a asigura o astfel de supraveghere în multe dintre țările cu incidență înaltă a tuberculozei. Cu toate acestea, în perioada premergătoare publicării actualelor definiții ale OMS au fost efectuate mai multe studii care pe de o parte au demonstrat raționalitatea supravegherii postterapeutice pentru practica clinică, evidențiind modificări importante în structura rezultatelor terapeutice, iar pe de altă parte au evidențiat fezabilitatea acestei abordări inclusiv în țările cu incidență înaltă a tuberculozei [200–203]. La modul practic supravegherea postterapie ar putea fi efectuată prin diferite soluții tehnice adaptate la contextul local cum ar fi: telefonarea directă a pacientului, obținerea informațiilor de la persoane de contact din comunitățile respective, utilizarea registrelor naționale de declarare a cazurilor de tuberculoză [13].

Biomarkeri micobacterieni alternativi aplicabili în monitorizarea tratamentului antituberculos

Dezavantajele metodelor de monitorizare a tratamentului bazate pe identificarea agentului microbial (timpul îndelungat al culturii, persistența fragmentelor ADN din micobacteriile moarte) impune identificarea de noi biomarkeri și tehnologii care ar putea fi aplicate în monitorizarea eficacității terapeutice. Printre acestea sunt TB-MBLA (*TB molecular bacterial load assay*), test care detectează și cuantifică doar micobacteriile viabile din speciunile biologice prin RT-qPCR (*Reverse Transcriptase quantitative PCR*) a subunităților ribozomale 16S a ARN

ribozomal (16S ARNr) [204]. Biomarkerul lipsește în micobacteriile moarte și permite identificarea unei încărcături micobacteriene minimale (10-100 de microorganisme pe ml de specimen). Reducerea cantității de 16S ARNr respectiv reflectă diminuarea numărului micobacteriilor viabile și obiectivizează eficacitatea tratamentului. O altă tehnică se bazează pe aprecierea ratei de sinteză a ARNr micobacterian exprimată prin raportul dintre precursorii ARNr (ETS1 sau ITS1) și ARNr matur (16S23S), o rata mai mare de sinteză reflectă o încărcătură bacteriană mai înaltă [205]. În același context, se înscrie tehnica prelucrării cu propidium monoazide (PMA) sau etidium monoazide (EMA) a specimenelor examinate prin PCR sau RT-PCR [206, 207]. EMA și PMA sunt coloranți care pot penetra prin membrana micobacteriană și modifica ADN-ul micobacteriilor moarte, prevenind amplificarea acestuia. Astfel, este asigurată detectarea doar a micobacteriilor viabile fapt care permite aplicarea pentru monitorizarea terapeutică inclusiv a tehnicilor curente de tip Xpert MTB/Rif. Menționăm și eventuala posibilitate de a monitoriza dinamica răspunsului terapeutic prin aprecierea cantității de proteină MPT64 produsă doar de micobacteriile vii la încălzirea probei examinate până la temperatura de 46°C [208].

Biomarkeri alternativi ai organismului uman aplicabili în monitorizarea tratamentului antituberculos

Sensibilitatea biomarkerilor micobacterieni și a celor clinico-imagistici utilizați pentru monitorizarea eficacității tratamentului antituberculos la ora actuală, nu permite individualizarea duratei tratamentului antituberculos, aceasta fiind una standard și determinată în mod empiric. Considerarea răspunsului biologic individual al organismului uman ar putea permite individualizarea duratei terapiei și spori acuratețea concluziilor privitor la vindecare. În acest context există numeroase tentative de identificare a unor biomarkeri ai organismului uman care ar permite aprecierea răspunsului terapeutic. Cercetările curente în special sunt focusate pe determinarea dinamicii răspunsului imun din perspectiva profilului transcriptomic sau metabolomic precum și al dinamicii unor citokine. La fel, sunt încercări de a corela răspunsul terapeutic cu parametrii imagistici și funcționali ai aparatului respirator, dar și unele semne clinice apreciate atât independent cât și în cadrul unor scoruri mai complexe [209].

Aprecierea profilului modificărilor transcriptomice în sângele periferic asociate cu statutul de vindecare pare a fi deosebit de promițătoare. Aplicarea diverselor seturi de semnale transcriptomice, denumite și semnături transcriptomice, (RISK6, TB-22, etc) permite evidențierea răspunsului terapeutic atât la etapele inițiale cât și la încheierea tratamentului [210–214]. Majoritatea semnăturile transcriptomice descrise includ gene implicate în calea de semnalizare a

interferonului de tip I. Rezultatele publicate au fost validate pe pacienți din diverse regiuni geografice inclusiv bolnavi HIV pozitivi. Cu toate acestea, studiile clinice randomizate care ar demonstra eficacitatea tratamentului ghidat de aplicarea acestor semnături încă urmează a fi efectuate.

Markerii răspunsului imun celular ar putea fi și ei aplicați în monitorizarea eficacității terapeutice. Astfel, a fost observat declinul pe parcursul tratamentului antituberculos a nivelului limfocitelor T, care exprimă CD38, HLA-DR și Ki-67 [215, 216]. Însă similar semnăturilor transcriptomice, anterior implementării practice este necesară validarea clinică precum și identificarea unor tehnologii de fenotipare celulară aplicabile inclusiv la nivelurile primare de acordare a asistenței medicale.

Tentativele de identificare a unor biomarkeri citokinici detectabili în sângele periferic în scopul monitorizării eficacității terapiei nu s-au soldat la ora actuală cu rezultate aplicabile în practica clinică. Astfel, chiar dacă au fost descrise diferențe dintre persoanele sănătoase și bolnavii de tuberculoză în nivelurile serice a astfel de citokine precum IL-4, IL-6, INF- γ , TNF- α , IP-10, sensibilitatea și specificitatea în cazul aplicării în scopul monitorizării tratamentului sunt suboptimale [217].

În contextul potențialilor biomarkeri de monitorizare a tratamentului trebuie amintite unele proteine serice pentru care există date ce demonstrează corelarea dintre nivelurile proteice și rezultatele terapiei. Astfel, în cazul proteinei C reactive există publicații care sugerează asocierea spitalizării și a decesului la bolnavii de tuberculoză cu o reducere sub 55%, comparativ cu nivelul inițial, la termenul de 2 săptămâni de la inițierea tratamentului [218]. Date similare au fost publicate pentru apolipoproteine și unele fracții ale complementului [219, 220]. La fel, există rapoarte privitor la capacitatea de discriminare dintre vindicare și riscul de recurență a unor semnături proteomice (TNF- β , sIL-6R, IL-12p40 și IP-10) [221].

Abordările metabolomice, în contextul monitorizării terapeutice, sunt la etapa studiilor de evaluare a dinamicii modificărilor metaboliților pe parcursul tratamentului. Unele date existente sugerează potențialul rol al metaboliților triptofanului [222].

1.6 Concluzii la capitolul 1

1. Pe parcursul ultimul deceniu atât la nivel internațional cât și în Republica Moldova s-a înregistrat ameliorarea lent progresivă a celor mai importanți indicatori epidemiologici ai tuberculozei (incidența și mortalitatea). Cu toate acestea problema cazurilor de boală prin tulpini MDR ale *M. tuberculosis* rămâne a provocare majoră pentru controlul eficient și atingerea obiectivului de eliminare a tuberculozei.

2. Diagnosticul infecției tuberculoase latente (ITBL) la ora actuală rămâne a fi unul imperfect, fiind lipsit de acuratețea necesară diferențierii diferitelor statute ale infecției cu *M. tuberculosis* (ITBL, tuberculoza activă, boală suportă), astfel că identificarea de noi biomarkeri și soluții tehnologice rămâne un imperativ al cercetărilor la acest capitol.

3. În prezent paleta testelor microbiologice pentru confirmarea tuberculozei active și testarea sensibilității la medicamentele antituberculoase este una extrem de variată , incluzând atât teste clasice precum microscopia și metodele pe bază de cultură, cât și o serie întreagă de teste molecular-genetice. Cu toate acestea optimizarea tehnicilor de efectuare a metodelor clasice și creșterea capacităților și acurateței diagnostice a testelor moleculare ar putea contribui la eficientizarea primelor și creșterea gradului de aplicabilitate în practica curentă a celor din urmă.

4. Tratamentul tuberculozei la ora actuală se bazează pe o serie de principii bine definite și verificate atât experimental cât și empiric, cu toate acestea reducerea duratei tratamentului atât în tuberculoza sensibilă cât și cea rezistentă, de rând cu identificarea de noi compuși și scheme terapeutice mai eficiente pentru tratamentul tuberculozei MDR, sunt absolut necesare pentru a asigura aderența, toleranța medicației și vindecarea bolnavilor de tuberculoză.

5. În lipsa unor biomarkeri suficient de specifici monitorizarea și evaluarea eficacității tratamentului antituberculos, în mare parte se bazează pe criterii microbiologice și de aderență terapeutică care permit doar concluzii indirecte privitor la eliminarea definitivă a infecției cu *M. tuberculosis* din organismului uman. Acest aspect impune o durată nediferențiată a tratamentului antituberculos stabilită mai mult empiric. Identificarea de biomarkeri mai specifici, iar în lipsa acestora de criterii alternative de stabilire a vindecării este un pas indispensabil în eficientizarea tratamentului antituberculos.

2. RĂSPUNSUL CITOKINIC SPECIFIC ÎN DIFERENȚIEREA STATUTELOR CLINICE ALE INFECȚIEI CU *M. TUBERCULOSIS*

Interacțiunea dintre *M. tuberculosis* și sistemul imun al organismului uman poate rezulta în mai multe statute clinico-patogenetice precum: eliminarea infecției, infecția tuberculoasă latentă (ITBL) și tuberculoza activă cu sau fără manifestări clinico-imagistice [223]. Diferențierea dintre aceste statute, prin intermediul unui test paraclinic cu acuratețe diagnostică înaltă, ar permite identificarea persoanelor eligibile pentru tratamentul preventiv al infecției tuberculoase. Acesta din urmă are un impact demonstrat în reducerea morbidității și mortalității prin tuberculoză atât la nivel populațional cât și în grupurile cu risc sporit de îmbolnăvire [224]. În același timp, testele aplicate în prezent (TCT, IGRA) pentru diagnosticul ITBL nu oferă acuratețea diagnostică dorită pentru diferențierea de tuberculoza activă. Astfel, identificarea de noi biomarkeri și tehnologii alternative aplicabile pentru diferențierea statutelor clinice ale infecției cu *M. tuberculosis* este printre imperativele cercetărilor în domeniu. În acest context studiile prin citometrie în flux au sugerat valoarea adăugată a aprecierii nu doar a răspunsului prin INF- γ (determinat prin testele IGRA), dar și a altor citokine precum IL-2 sau TNF α . Fiabilitatea și fezabilitatea aplicării în condiții clinice a acestor citokine rămâne incertă. La fel, efectuarea citometriei în flux implică manipulări laborioase și costuri frecvent prea mari pentru aplicarea în practica curentă, în special în regiunile cu incidență înaltă a tuberculozei. În prezentul capitol sunt descrise rezultatele aprecierii răspunsului citokinic prin INF- γ și/sau IL-2 al celulelor mononucleare din sângele periferic (CMSP) în diferențierea statutelor clinice ale infecției tuberculoase apreciate prin tehnica FluoroSpot bicolor (AID, Straßberg, Germany).

2.1. Material și metodă

Înrolarea în studiu și examinările de laborator aferente acestui compartiment al lucrării au fost realizate în Clinica medicală și respectiv Laboratorul clinica bolilor infecțioase ale Centrului de cercetări din Borstel, Germania.

Răspunsul citokinic al CMSP a fost apreciat în 4 cohorte de persoane caracterizate printr-un statut clinic diferit al infecției cu *M. tuberculosis*: 1) persoane cu ITBL, 2) bolnavi cu tuberculoză activă, 3) persoane cu anamneză de tuberculoză vindecată, 4) persoane sănătoase. Cohortele au fost definite în baza următoarelor criterii:

1. Persoane cu ITBL - persoane cu rezultat pozitiv al testului IGRA-EliSpot, la care a fost exclusă tuberculoza activă în baza lipsei semnelor clinice, examenului radiografic al cutiei toracice nesugestiv pentru tuberculoză și rezultat negativ al culturii din spută;

2. Bolnavi cu tuberculoză activă - pacienți cu tuberculoză pulmonară confirmată prin rezultatul pozitiv al culturii sau al unui test molecular-genetic pe bază de PCR din spută sau dintr-un specimen bronhoscopic, indiferent de rezultatul testului IGRA-EliSpot;
3. Persoane cu tuberculoză vindecată - persoane cu anamneză documentată de tuberculoză diagnosticată, tratată și vindecată;
4. Persoane sănătoase - persoane voluntare fără anamneză sau semne clinice și/sau imagistice de tuberculoză și rezultat negativ al testului IGRA-EliSpot.

De la fiecare dintre participanții incluși în studiu au fost colectate 20 ml de sânge venos periferic, în care a fost apreciat răspunsul citokinic al CMSP prin INF- γ sau/și IL-2 la stimularea cu antigenele micobacteriene specifice prin tehnicile FluoroSpot (AID, Straßberg, Germania) și IGRA-EliSpot (T-Spot.TB, Oxford Immunotec, Abingdon, Regatul Unit).

Rezultatele stimulării secreției citokinice apreciate prin FluoroSpot au fost analizate în scopul diferențierii dintre cele 4 statute clinice ale infecției tuberculoase, care caracterizează fiecare dintre cohortele de studiu. În calitate de teste de referință au fost considerate cultura la *M. tuberculosis* - pentru tuberculoza activă și IGRA-EliSpot pentru ITBL. Persoanele sănătoase și cele cu anamneză de tuberculoză vindecată au fost considerate în calitate de grupuri de control. Acuratețea de diferențiere dintre statutele clinice ale infecției tuberculoase a fost apreciată prin compararea numărului total de CMSP secretoare de INF- γ^+ sau IL-2 $^+$, numărului de CMSP secretoare de ambele citokine IL-2 $^+$ INF- γ^+ , precum și CMSP secretoare doar de o singură citokină (IL-2 $^+$ IFN- γ^- sau IL-2 $^-$ IFN- γ^+).

Aprecierea răspunsului citokinic INF- γ sau/și IL-2 al PMC

Răspunsul citokinic a fost apreciat prin stimularea CMSP izolate prin centrifugare cu gradient de densitate Ficoll Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany). Alicote perechi a câte 200.000 de celule per godeu au fost incubate peste noapte pe microplăci de 96 godeuri prefabricate, în 200 μ l de RPMI 1640 (PAA Laboratoris GmbH, Pasching, Austria) îmbogățit cu ser fetal bovin de 5%. Pentru IGRA-EliSpot au fost utilizate plăcile T-Spot.TB (Oxford Immunotec Ltd., Abingdon, Regatul Unit), iar pentru FluoroSpot au fost utilizate plăcile AID (Straßberg, Germania).

În conformitate cu recomandările producătorului incubarea tuturor celulelor în plăcile FluoroSpot a fost efectuată cu adăugarea anticorpilor anti-CD28 (0,5 μ g/mL, AID, Straßberg, Germania). În calitate de control negativ au fost utilizate CMSP nestimulate. Pentru testul IGRA-EliSpot drept control pozitiv au fost utilizate CMSP stimulate cu anti-CD3 (10ng/mL, clone X35, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany), iar în cazul FluoroSpot CMSP au fost utilizat un control pozitiv suplimentar - CMSP stimulate cu PWM (pokeweed mitogen, 5 μ g/mL, Biochrom

AG, Berlin, Bielefeld). În ambele teste, IGRA-EliSpot și FluoroSpot, stimularea PMC a fost efectuată cu doi antigeni specifici *M. tuberculosis* - ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6 kDa) și CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10 kDa) în volum de 50 µl fiecare. După 18 ore de incubare procedeele de spălare și colorare au fost efectuate conform recomandărilor producătorilor IGRA-EliSpot [225] și FluoroSpot [226].

Rezultatele ambelor teste, FluoroSpot și IGRA-EliSpot, au fost cuantificate cu dispozitivul de citire AID EliSpot și software corespunzător. Numărul CMSP secretoare de citokine a fost raportat ca număr de celule formatoare de puncte (CFP). Numărul de CFP identificate în controlul negativ în fiecare caz a fost dedus din numărul de CFP observat în godeurile stimulate cu antigeni specifici.

Testul FluoroSpot au fost considerat valid în cazul în care în controlul pozitiv anti-CD3 sau PWM au fost determinate nu mai puțin de 50 CFP per godeu de IL-2⁺ și nu mai puțin de 50 CFP per godeu de INF-γ⁺ (după deducerea numărului de CFP înregistrate în controlul negativ), în caz contrar rezultatul a fost considerat indeterminat. În cazul testelor valide, numărul de CFP din godeurile stimulate cu ESAT-6 și CFP-10 (după deducerea CFP din controlul negativ) a fost înregistrat și analizat ca număr absolut pentru fiecare dintre citokine [226].

Rezultatele IGRA-EliSpot au fost considerate pozitive în caz de identificare per godeu a cel puțin 5 CFP după stimularea cu ESAT-6 și CFP-10 (după deducerea CFP din controlul negativ), iar numărul total de CFP era cel puțin dublu comparativ cu cel din controlul negativ. Rezultatele IGRA-EliSpot au fost considerate negative dacă ele nu au întrunit criteriile rezultatului pozitiv și dacă numărul de CFP în controlul pozitiv nu a fost mai mare de 20 (după deducerea CFP din controlul negativ) și era cel puțin dublu comparativ cu cel din controlul negativ. Rezultatele care nu au întrunit criteriile de rezultat pozitiv sau rezultat negativ au fost considerate indeterminate [227].

Analiza statistică

Pentru analiza comparativă dintre grupurile de studiu a fost aplicat testul Mann-Whitney (U), pentru variabilele nonparametrice perechi a fost aplicat testul Wilcoxon (Signed Rank). Gradul de corelație dintre IGRA-EliSpot și FluoroSpot a fost apreciat prin coeficientul R², iar pentru a aprecia gradului de corespundere a rezultatelor dintre cele două teste a fost utilizat testul Bland-Altman, în acest scop fiind calculate diferența medie ((IGRA-EliSpot – FluoroSpot)/69) și intervalele de corespundere de 95% (diferența medie ± 1,96 deviația standard (DS)). Analiza ROC a fost aplicată pentru a aprecia valorile prag ale CFP secretorii de citokine secundar stimulării prin ESAT-6 și CFP-10. Valoarea prag cu cea mai înaltă sensibilitate și specificitate a fost determinată

aplicând criteriul Youden. Statistic semnificative au fost considerate valorile $p < 0,05$. Analiza statistică a fost efectuată în programul GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

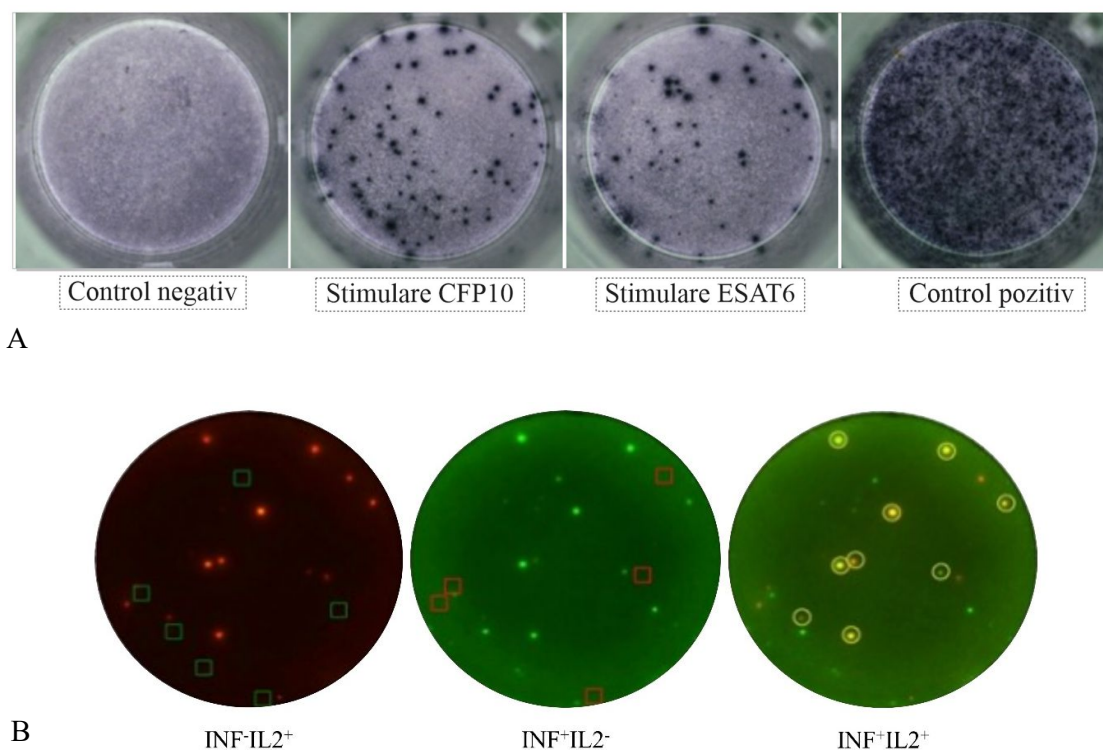


Figura 2.1. A. Vizualizarea CMSP secretoare de INF- γ în IGRA-EliSpot . B. Vizualizarea celulelor secretorii de INF și/sau IL-2 în Fluorospot; Vizualizarea aceluiași godeu în filtru de lumină roșie (marcaj fluorescent Streptavidin, petele fluorescente corespund celulelor secretoare de IL-2, pătratele verzi indică celule nesecretoase de IL-2) și în filtru de lumină verde (marcaj fluorescent FITC, petele fluorescente corespund celulelor secretoare de INF- γ , pătratele roșii marchează celulele nesecretoare de INF- γ); celulele vizualizate în ambele filtre secretă atât IFN- γ cât și IL-2 (marcate cu cercuri galbene în filtru de lumină verde).

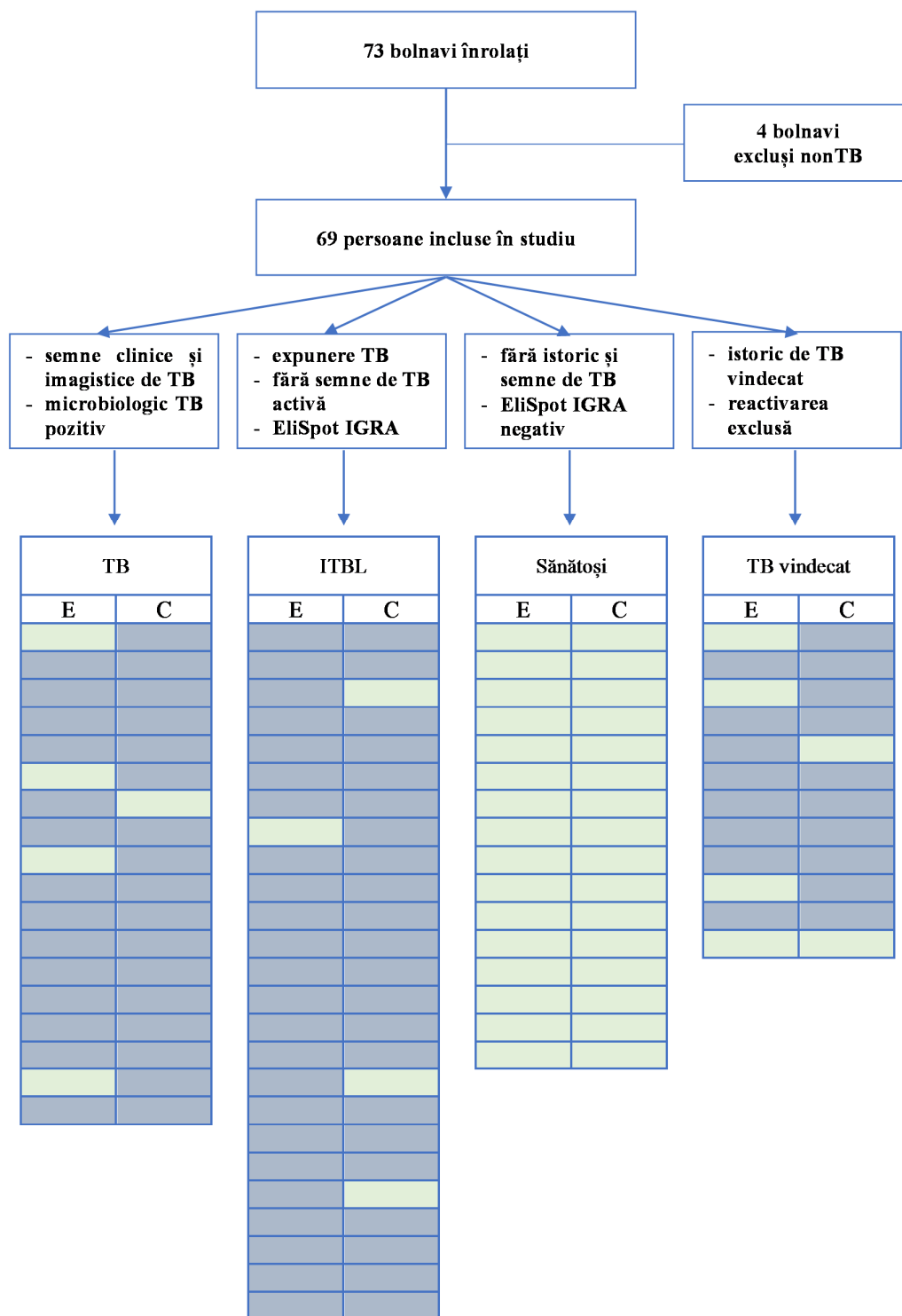


Figura 2.2 Identificarea și distribuția subiecților cercetării în cohortele analizate în baza rezultatelor culturii la *M. tuberculosis*, testului IGRA-EliSpot și amanezei. E - ESAT-6, C – CFP-10, pătrat verde - test IGRA-EliSpot negativ, pătrat albastru - test IGRA-EliSpot pozitiv.

2.2 Rezultatele aprecierii răspunsului citokinic

În studiu fost incluse 73 de persoane, dintre care 4 bolnavi, inițial diagnosticați cu tuberculoză, au fost excluși datorită stabilirii ulterioare a unui diagnostic alternativ (2 bolnavi - cancer bronho-pulmonar, 1 bolnav - pneumonie bacteriană, 1 bolnav - infecție pulmonară diseminată cu *M. caprae*). Dintre cele 69 de persoane incluse în analiza finală 25 au corespuns criteriilor de includere în cohorta ITBL, 18 - cohorta bolnavilor cu tuberculoză activă, 10 - cohorta cu tuberculoză vindecată, 16 - cohorta persoanelor sănătoase. Caracteristicile demografice și cele ale statului ITBL apreciate prin IGRA-EliSpot a persoanelor analizate în studiu sunt detaliate în **figura 2.1** și **tabelul 2.1**.

Tabelul 2.1. Caracteristicile demografice ale subiecților cercetării

	TB n=18	TB vindecat n=10	ITBL n=25	Sănătoși n=16	p
Vârsta (media ± DS)	44,8±3,2	58,9±4,9	46,0±2,04	45,5±3,07	>0,05
Sex (b/f)	12/6	7/3	16/9	7/9	>0,05

TB - tuberculoză, ITBL - infecția tuberculoasă latentă, b - masculin, f - feminin, n - numărul de cazuri, DS - deviația standard.

Dintre toate persoanele diagnosticate cu tuberculoză activă (n=18) doar una a avut cultura sputei la *M. tuberculosis* negativă. În cazul acestui bolnav diagnosticul de tuberculoză s-a bazat pe rezultatul pozitiv al testului PCR și rezultatul pozitiv al culturii la două alte persoane diagnosticate în același domiciliu cu bolnavul inclus în studiu. Toți bolnavii cu tuberculoză activă au avut testul IGRA-EliSpot pozitiv cel puțin la stimularea cu unul dintre antigenii specifici aplicați (ESAT-6, CFP-10) (**Figura 2.1**). Treisprezece dintre acești bolnavi au avut rezultat pozitiv IGRA-EliSpot la stimularea cu ambii antigeni, 4 bolnavi au răspuns doar la CFP-10, iar unul a fost pozitiv doar la stimularea cu ESAT-6.

În cazul persoanelor cu tuberculoză vindecată (n=10) una a avut rezultat negativ IGRA-EliSpot la stimularea atât cu CFP-10 cât și cu ESAT-6, în timp ce 6 persoane au răspuns la ESAT-6, iar altele 8 la CFP-10.

În cohorta ITBL 24/25 de persoane au avut răspuns pozitiv IGRA- EliSpot la stimularea cu ESAT-6 și 22/25 un răspuns pozitiv la CFP-10. Toate 16 persoane din cohorta de sănătoși au avut un răspuns IGRA-EliSpot negativ.

În mod previzibil aprecierea izolată prin IGRA-EliSpot a INF- γ indus fie prin stimularea cu ESAT-6 fie prin CFP-10 nu a permis diferențierea dintre statutele clinice ale infecției tuberculoase în cohortele analizate (**Figura 2.2**).

2.3 Concordanța dintre IGRA-EliSpot și FluoroSpot

Pentru a aprecierea gradul de concordanță dintre aprecierea răspunsului citokinic determinat prin IGRA-EliSpot și cel determinat prin FluoroSpot, a fost comparat numărul total de CMSP secretorii de INF- γ ale aceleași persoane măsurat prin ambele tehnici diagnostice.

Compararea numărului de CMSP INF- γ^+ apreciat prin cele două teste la bolnavii cu tuberculoză activă a evidențiat diferențe la limita semnificației statistice (ESAT-6 $p=0,044$, CFP-10 $p=0,039$, **Figura 2.3, 2.4**). În cazul persoanelor cu tuberculoză vindecată și a celor sănătoase nu au fost evidențiate diferențe dintre cele două metode de testare. La persoanele cu ITBL s-a observat un număr semnificativ mai mic de CMSP INF- γ^+ indus prin stimularea cu ESAT-6 la aprecierea prin FluoroSpot comparativ cu cea prin IGRA-EliSpot.

Analiza corelațională a numărului de CMSP INF- γ^+ indus la stimularea cu ESAT-6 sau CFP-10 a evidențiat o concordanță moderată dintre rezultatele obținute prin IGRA-EliSpot versus FluoroSpot, respectiv $R^2=0,67$, $p<0,0001$ și $R^2=0,73$, $p<0,0001$ (**Figura 2.5**).

Analiza gradului de corespundere dintre cele două teste prin analiza Bland-Altman a evidențiat o subestimare ușoară a numărului de CMSP INF- γ^+ la aplicarea FluorSpot. Diferența medie în numărul de CMSP INF- γ^+ induse de ESAT-6 fiind de 5,25 CMSP (DS $\pm 23,82$), iar în cazul celor induse de CFP-10 6,98 (DS $\pm 39,7$), rezultatele IGRA-EliSpot și FluoroSpot având o distribuție largă (intervalul de corespundere de 95% pentru ESAT-6 = 41,43 - 51,94, pentru CFP-10 = 70,84 - 84,80), variabilitatea diferențelor crescând o dată cu numărul de CMSP detectate (**Figura 2.6**).

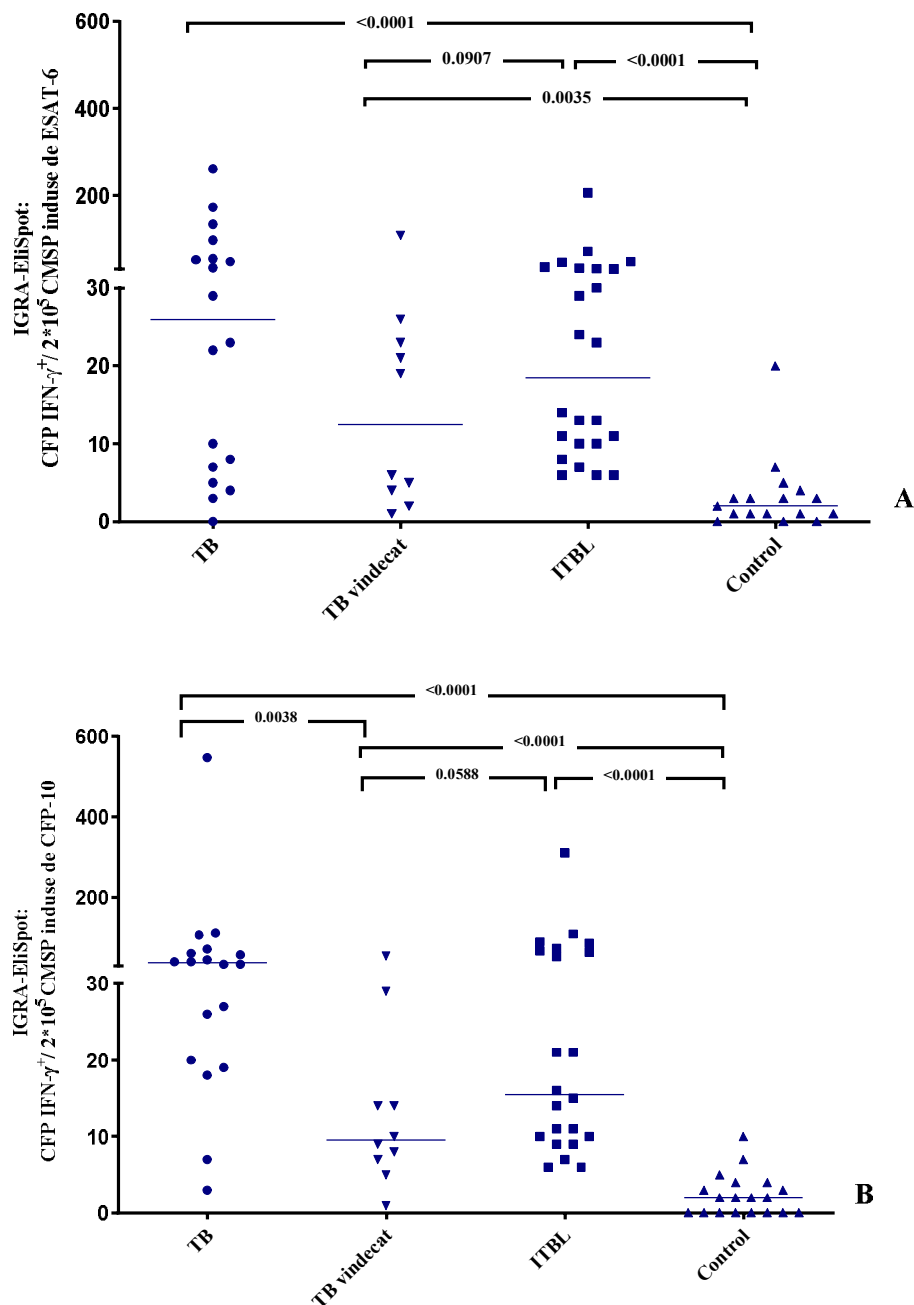


Figura 2.3. Rezultatul testării prin IGRA-EliSpot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B). Este prezentat numărul de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de INF- γ exprimate prin numărul celulelor formatoare de puncte (CFP) a fiecărui participant în studiu din grupurile analizate și mediana numărului CFP per grup (linia orizontală). Valorile $p > 0,05$ nu sunt indicate. ITBL - infecția tuberculoasă latentă.

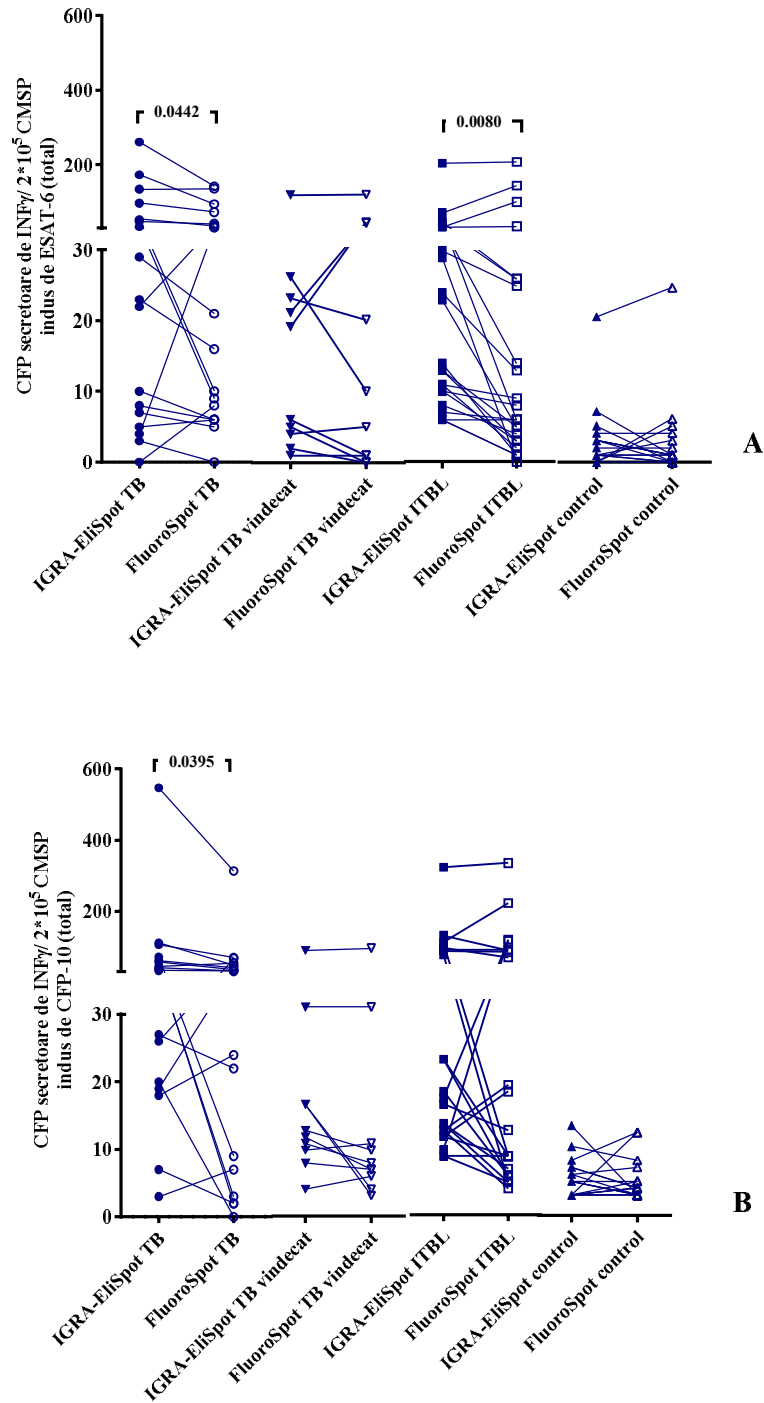


Figura 2.4. Compararea rezultatelor IGRA-Elispot și Fluorospot obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B). Sunt comparate numărul de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de INF- γ exprimate prin numărul celulelor formatoare de puncte (CFP) a fiecărui participant în studiu din grupurile analizate prin ambele teste. Valorile $p > 0,05$ nu sunt indicate. ITBL - infecția tuberculoasă latentă.

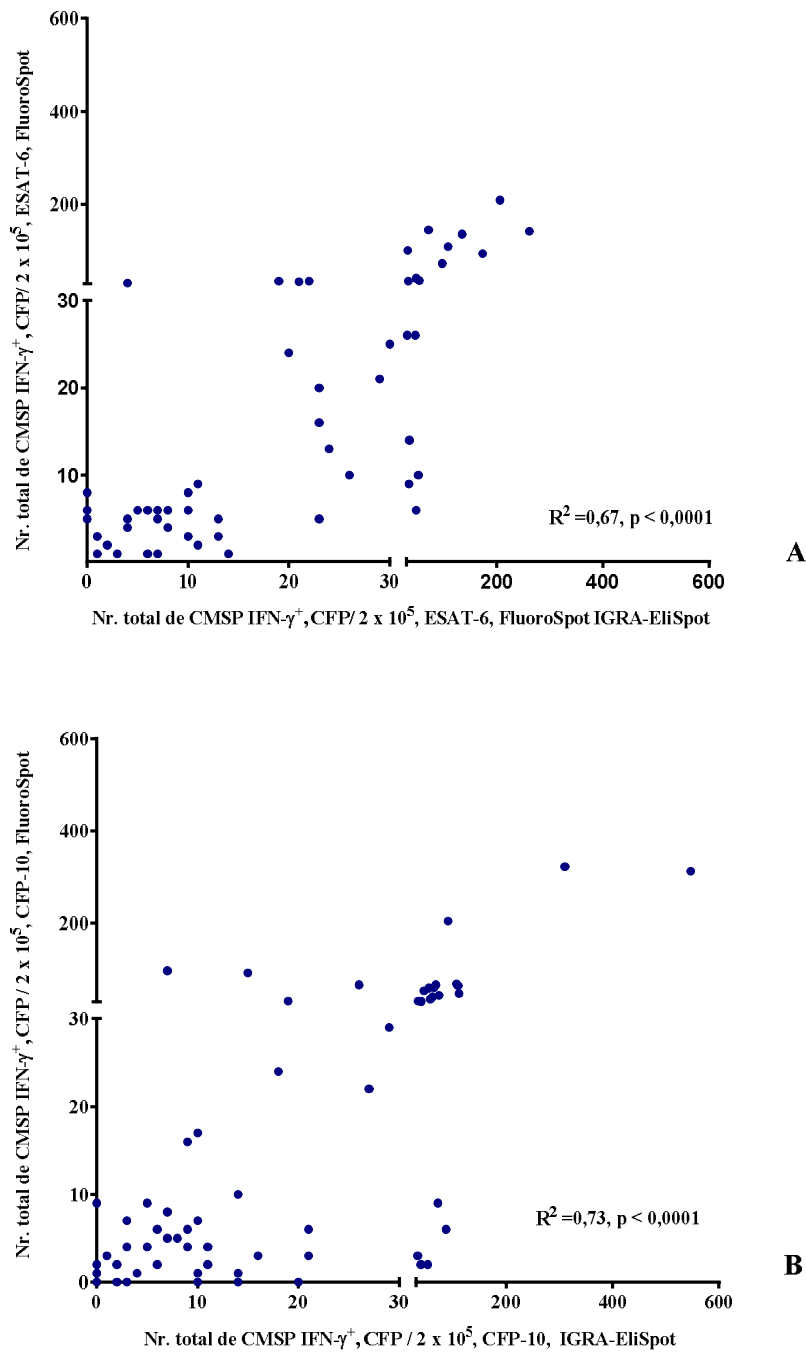


Figura 2.5. Analiza corelațională a rezultatelor testării prin IGRA-EliSpot și Fluorospot obținute la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B). Au fost corelate numărul de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de INF- γ apreciate prin ambele teste la fiecare dintre participanții studiului (n=69).

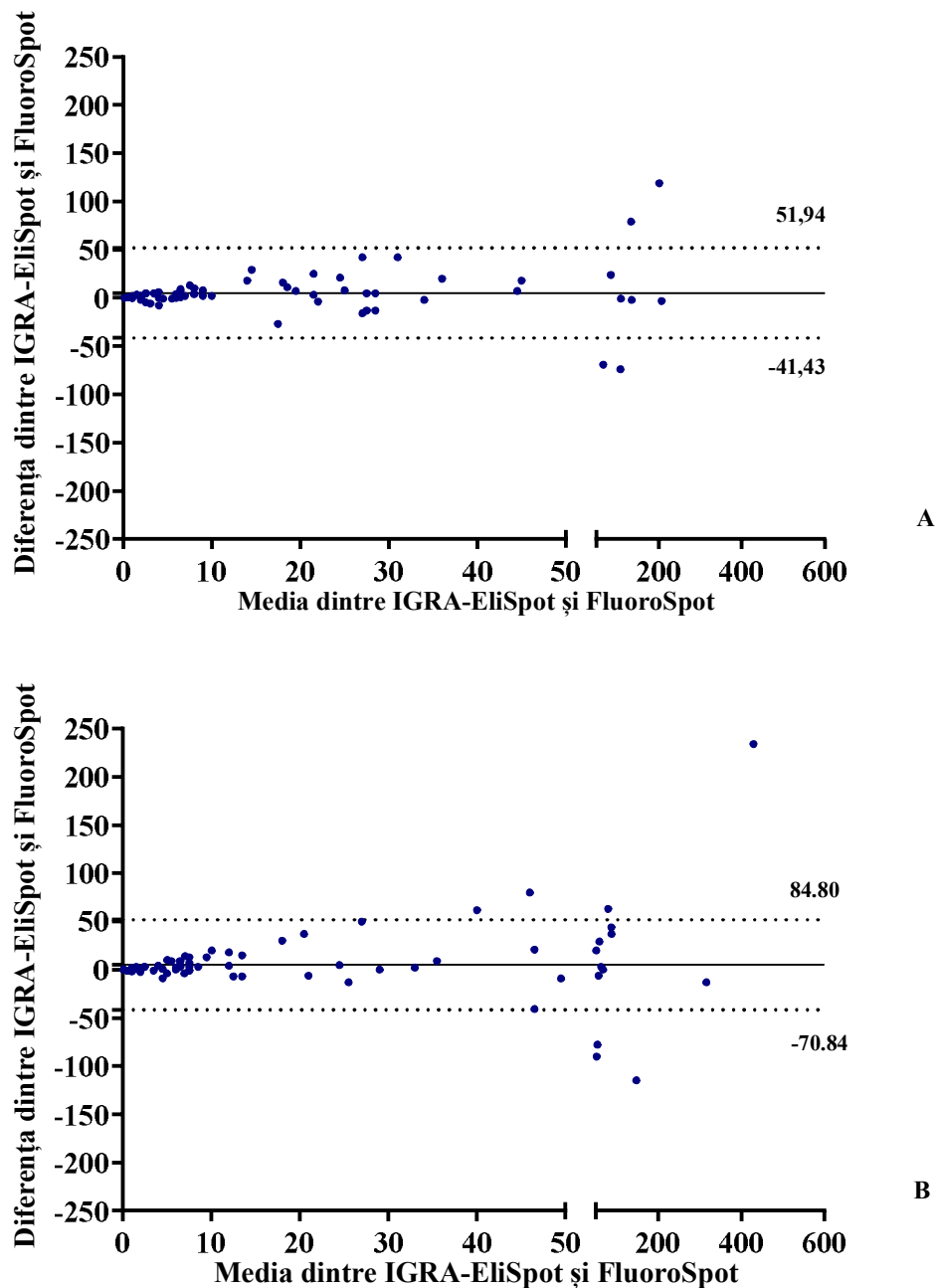


Figura 2.6. Concordanța dintre rezultatele testării prin IGRA-EliSpot și Fluorospot (analiza Bland-Altman) la stimularea cu ESAT-6 (A) și CFP-10 (B). Contrapuse numărul de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de INF- γ apreciat prin ambele teste la fiecare dintre participanții studiului (n=69).

2.4 Aprecierea prin FluoroSpot a răspunsului IL-2 și INF- γ indus de ESAT-6

Determinarea prin sistemul FluoroSpot a citokinelor induse prin stimularea cu ESAT-6 a evidențiat un număr mai mare de CMSP secretoare de IL-2 la bolnavii de tuberculoză și persoanele cu ITBL, de cât cel la persoanele sănătoase respectiv mediana 9,5 CFP/200.000 CMSP versus 2 CFP/200.000 CMSP, $p=0,001$ și 4 CFP/ 200.000 CMSP versus 2 CFP/ 200.000 CMSP, $p=0,02$, (**Figura 2.3 A**).

Numărul CMSP secretoare de INF- γ a fost semnificativ diferit la bolnavii de tuberculoză sau la persoanele cu ITBL comparativ cu sănătoșii respectiv mediana 18,5 CFP 200.000 CMSP versus 1 CFP/ 200.000 CMSP, $p<0,0001$ și 6 CFP/ 200.000 CMSP versus 1 CFP/ 200.000 CMSP, $p=0,0003$, (**Figura 2.3 B**).

Unicul subset de CMSP pentru care au fost evidențiate diferențe semnificative dintre bolnavii de tuberculoză și persoanele cu ITBL la stimularea cu ESAT-6 au fost cele cu profil secretor de tip IL-2⁻ IFN- γ ⁺, mediana 13 CFP/ 200.000 CMSP versus 5 CFP/ 200.000 CMSP, $p=0,0136$, (**Figura 3.2 D**). La fel, numărul CMSP IL-2⁻ IFN- γ ⁺ este mai mare la bolnavii de tuberculoză comparativ cu cel la persoanele cu anamnestice de tuberculoză vindecată, dar fără semnificație statistică, mediana 13 CFP/ 200.000 CMSP versus 6 CFP/ 200.000 CMSP, $p=0,095$, (**Figura 3.2 D**).

În cazul CMSP secretorii de ambele citokine IL-2⁺IFN- γ ⁺ diferențe semnificative au fost evidențiate doar între persoanele cu anamneză de tuberculoză vindecată și cele sănătoase (mediana 2,5 CFP/200.000 CMSP versus 0 CFP/200.000 CMSP, $p=0,007$, **Figura 2.3 E**).

În contextul diferențelor în profilul de secreție a IL-2 și IFN- γ între grupurile analizate, enumerate mai sus, trebuie menționat faptul că suprapunerile observate în expresia tuturor celor 5 pattern-uri citokinice în cohortele analizate nu ar permite diferențierea statului clinico-imunologic al infecției tuberculoase în cazul pacientului individual în practica clinică.

Compararea ratei fiecărui tip de CMSP cu un anumit profil de secreție al citokinelor analizate (IL-2⁺ IFN- γ ⁻, IL-2⁻ IFN- γ ⁺ și IL-2⁺ IFN- γ ⁺) nu a evidențiat diferențe semnificative între bolnavii de tuberculoză și persoanele cu ITBL sau cele cu anamneză de tuberculoză vindecată (**Figura 2.3 F**).

2.5 Aprecierea prin FluoroSpot a răspunsului IL-2 și INF- γ indus de CFP-10

În cazul aprecierii răspunsului citokinic indus de stimularea cu CFP-10 s-au observat diferențe semnificative în numărul de CMSP cu profil secretor IL-2⁻ IFN- γ ⁺ între persoanele cu anamneză de tuberculoză vindecată în comparație cu cel la bolnavii de tuberculoză, (mediana 3

CFP/200.000 CMSP versus 15,5 CFP/200.000 CMSP, $p=0,007$) și cel la persoanele sănătoase (mediana 3 CFP/ 200.000 CMSP versus 0 CFP/ 200.000 CMSP, $p=0,01$, **Figura 2.3 D**).

Numărul total de celule secretorii de INF- γ^+ precum și a celor IL-2 $^+$ IFN- γ^+ și IL-2 $^-$ IFN- γ^+ la persoanele cu ITBL sau cele sănătoase a fost mai mic decât la bolnavii de tuberculoză,.

La fel, numărul total de CMSP secretoare de IL-2 $^+$, de rând cu cel al celor cu profil citokinic IL-2 $^+$ IFN- γ^- la persoanele sănătoase a fost mai mic comparativ cu cel la bolnavii de tuberculoză.

Compararea ratelor CMSP cu diverse profiluri citokinice arată o dominare a CMSP IL-2 $^-$ IFN- γ^+ în tuberculoza activă, versus o distribuție aproximativ egală a IL-2 $^+$ IFN- γ^- , IL-2 $^+$ IFN- γ^+ și IL-2 $^-$ IFN- γ^+ la persoanele cu anamneză de tuberculoză și rata crescută a CMSP IL-2 $^+$ IFN- γ^- la persoanele cu ITBL (**Figura 2.3 F**).

2.6 Acuratețea diagnostică totală a testelor IGRA-EliSpot și FluoroSpot

Compararea curbelor ROC ale testelor IGRA-EliSpot și FluoroSpot au evidențiat că răspunsul total INF- γ^+ discriminează cel mai efectiv dintre staturile clinice de ale infecției cu *M. tuberculosis* - ITBL, tuberculoză activă, tuberculoză vindecată și sănătoși (**Figura 2.4, Tabelul 2.2**). La valoarea prag mai mare de 16 CFP/ 200.000 CMSP secretoare de INF- γ^+ prin stimularea cu CFP-10, la bolnavii cu tuberculoză activă, a fost demonstrată sensibilitatea de 76% și specificitatea de 89% (AUC 0,795, 95%ÎÎ 0,680-0,882). Rezultate similare au fost observate pentru FluoroSpot la o valoare prag mai mare de 5 CFP/ 200.000 CMSP secretoare de INF- γ^+ la stimularea cu ESAT-6 (AUC 0,751, 95%ÎÎ 0,632-0,847, sensibilitatea 59%, specificitatea 89%) și la valoarea prag de peste 6 SFC/ 200.000 PBMC cu profil citokinic IL-2 $^-$ IFN- γ^+ la stimularea cu ESAT-6- (AUC 0,77, 95%ÎÎ 0,653-0,862, sensibilitatea 72%, specificitatea 76%). La o valoare peste 12 CFP/ 200.000, care se prezintă drept optimă pentru CMSP secretoare de IL-2 $^+$ indusă de CFP-10, sensibilitatea și specificitatea au constituit 82% și 67% (AUC 0,724, 95%ÎÎ 0,603-0,825).

Astfel, aprecierea numărului celulelor secretoare IL-2 $^+$ dar nici a celor secretoare de INF- γ^+ nu permite diferențierea cu o acuratețe suficientă, dintre bolnavii de tuberculoză activă, persoanele cu ITBL, cele cu anamneză de tuberculoză vindecată și persoanele sănătoase.

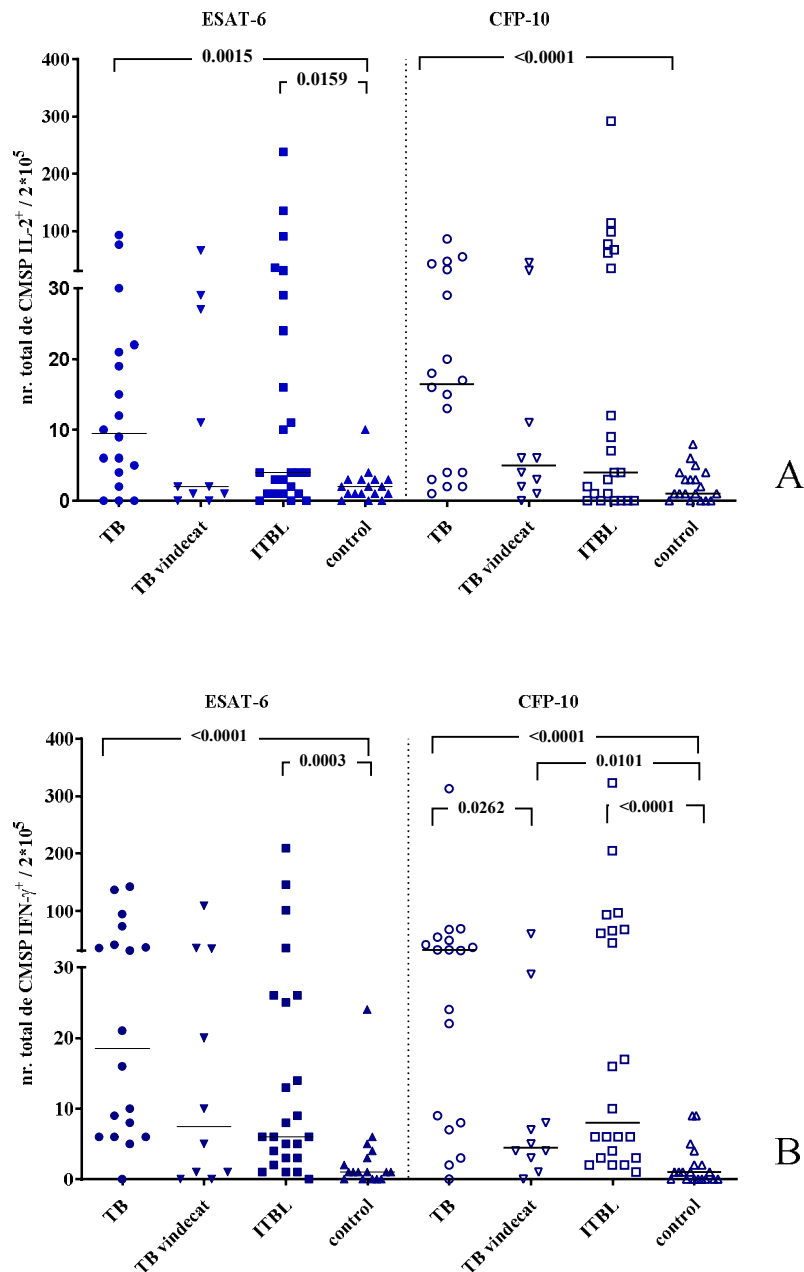


Figura 2.7. Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10. Este prezentat numărul total de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de IL-2 indiferent de profilul secretor de INF-γ (A) și numărul total al celor secretoare de INF-γ indiferent de profilul secretor de IL-2 (B), exprimate prin numărul celulelor formatoare de puncte (CFP) a fiecărui participant în studiu din grupurile analizate și mediana numărului CFP per grup (linia orizontală). Valorile $p > 0,05$ nu sunt indicate. ITBL - infecția tuberculoasă latentă.

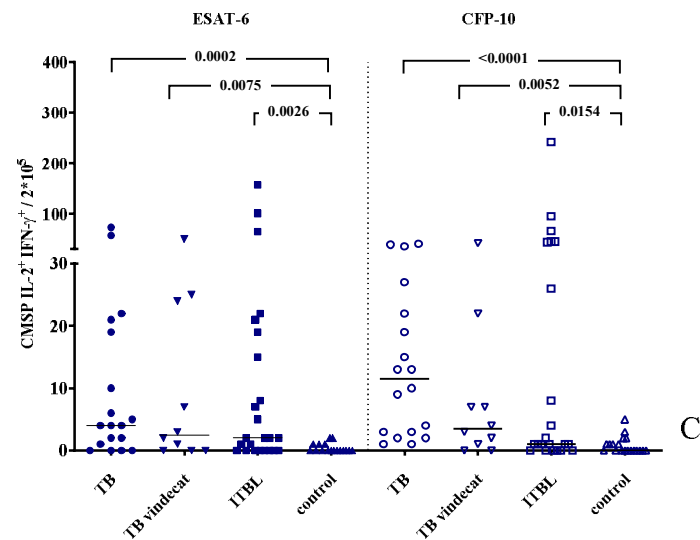
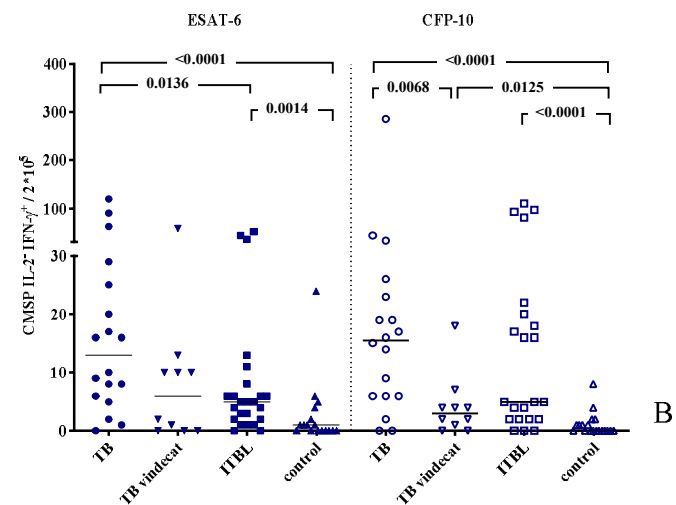
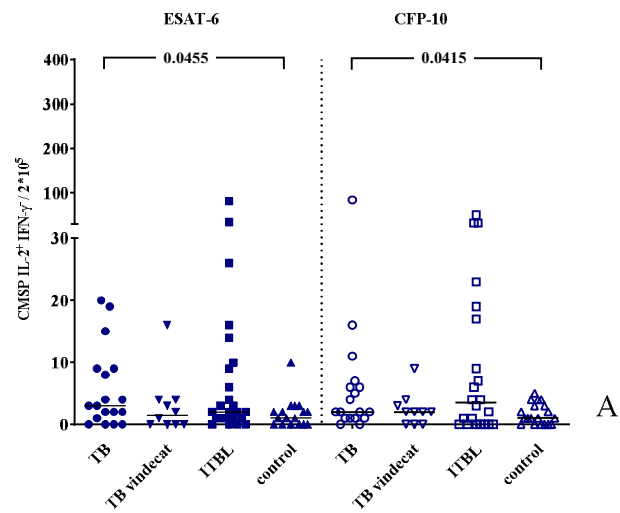


Figura 2.8. Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10. Este prezentat numărul de celule mononucleare din sângele periferic (CMSP) secretoare de IL-2+INF- γ (A), IL-2+INF- γ (B), IL-2+INF- γ (C), exprimate prin numărul celulelor formatoare de puncte (CFP) a fiecărui participant în studiu din grupurile analizate și mediana numărului CFP per grup (linia orizontală). Valorile $p > 0,05$ nu sunt indicate. ITBL - infecția tuberculoasă latentă.

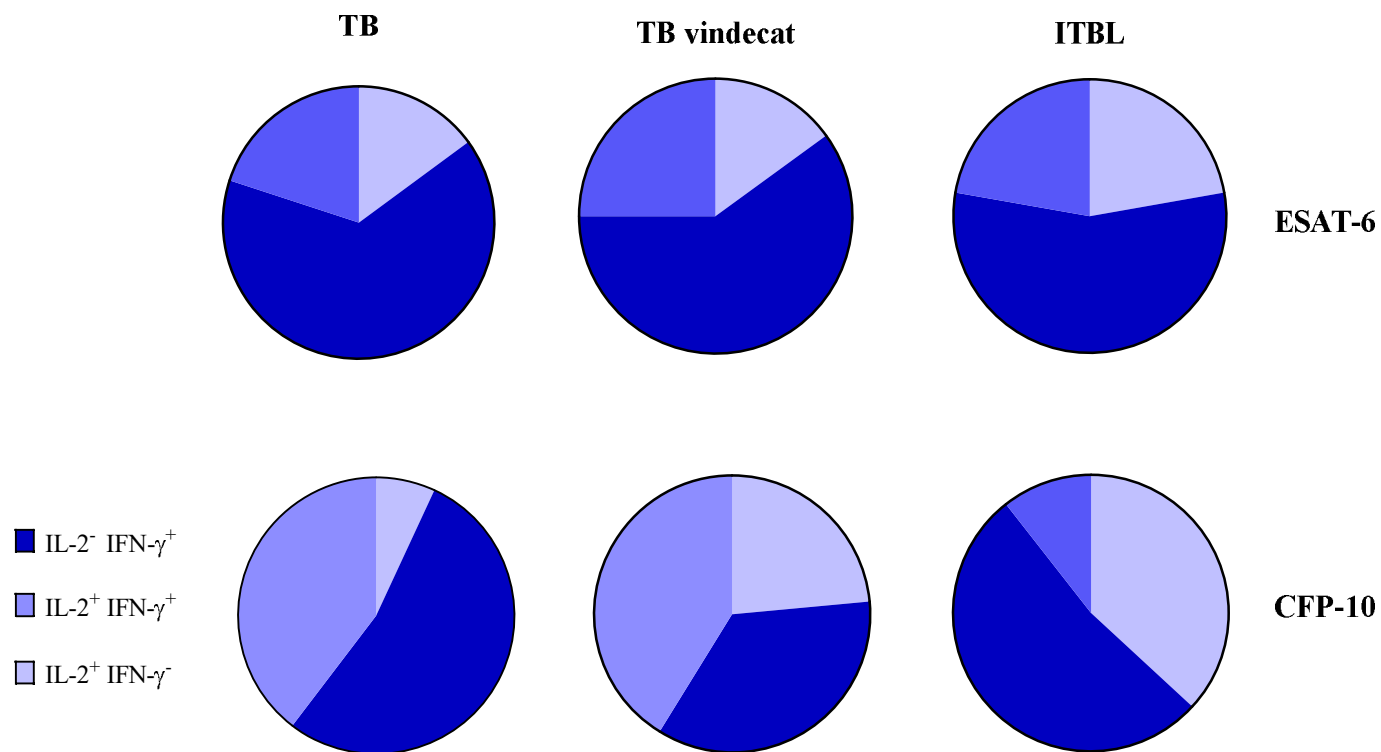


Figura 2.9. Rezultatul testării prin Fluorospot în grupurile analizate obținute la stimularea cu ESAT-6 și CFP-10. Este prezentată rata fiecărui tip de limfocite T după pattern-ul secreției citokinice IL-2-IFN-γ⁺, IL-2⁺IFN-γ⁺, IL-2⁺IFN-γ⁻ în grupurile de pacienți analizate: TB – bolnavi de tuberculoză, TB vindecată - tuberculoză vindecată, ITBL – infecție tuberculoasă latentă.

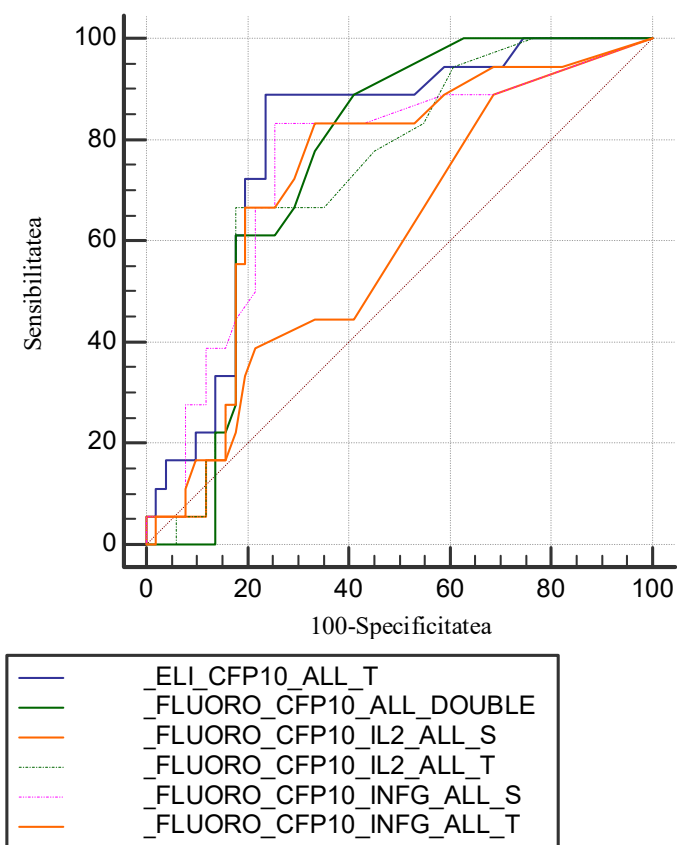
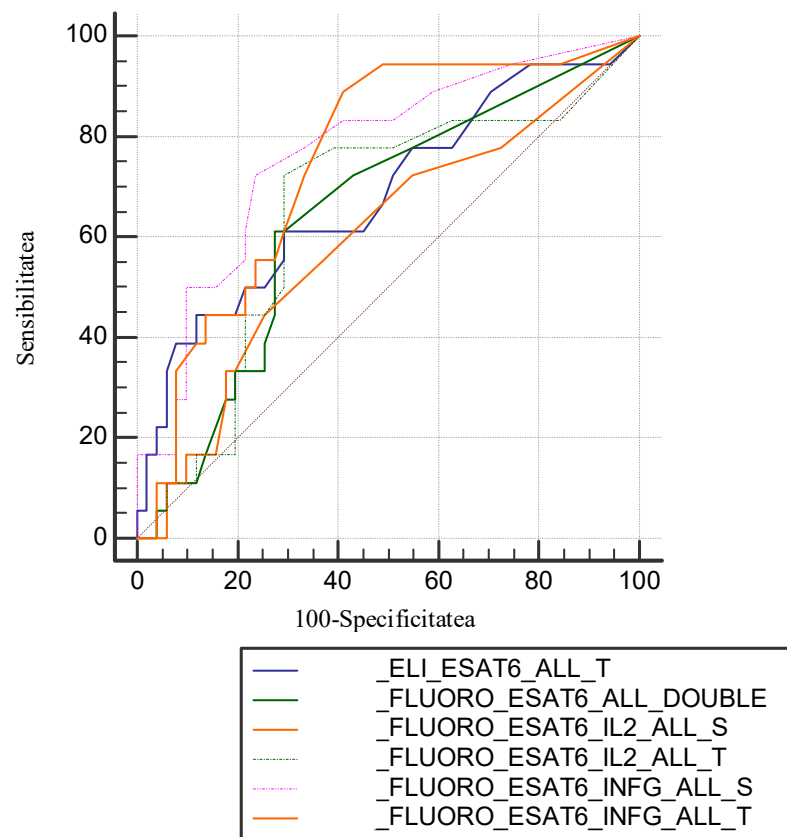


Figura 2.10. Analiza ROC a performanțelor diagnostice a aprecierii fenotipului secretor IL-2 INF- γ al limfocitelor T din sângele periferic în diferențierea bolnavilor cu tuberculoză activă de cei cu infecție tuberculoasă latentă și cei cu tuberculoză vindecată

Tabelul 2.2. Performanța IGRA-EliSpot și FluoroSpot de a diferenția tuberculoza activă, ITBL și tuberculoza vindecată.

			CFP valoare prag	Sensibilitate % (95%ÎÎ)	Specificitate % (95%ÎÎ)	LR+ (95%ÎÎ)	LR- (95%ÎÎ)	AUC (95%ÎÎ)
IGRA- EliSpot	ESAT-6	IFN- γ^+ total	>33	44,4 (21,5-69,2)	88,2 (76,1-95,6)	3,78 (1,5-9,4)	0,63 (0,4-1,0)	0,68 (0,56-0,79)
	CFP-10	IFN- γ^+ total	>16	88,9 (65,3-98,6)	76,5 (62,5-87,2)	3,78 (2,2-6,4)	0,15 (0,04-0,5)	0,79 (0,68-0,88)
Fluoro Spot	ESAT-6	IL-2 $^+$ total	>4	72,2 (46,5-90,3)	70,6 (56,2-832,5)	2,46 (1,5-4,1)	0,39 (0,2-0,8)	0,64 (0,52-0,75)
		IL-2 $^+$ /IFN- γ^-	>3	44,4 (21,5-69,2)	74,55 (60,4-85,7)	1,74 (0,9-3,5)	0,75 (0,5-1,2)	0,59 (0,47-0,71)
		IFN- γ^+ total	>5	88,9 (65,3-98,6)	58,8 (44,2-72,4)	2,16 (1,5-3,1)	0,19 (0,05-0,7)	0,75 (0,63-0,84)
		IL-2 $^-$ /IFN- γ^+	>6	72,2 (46,5-90,3)	66,7 (52,1-79,2)	3,07 (1,7-5,4)	0,36 (0,2-0,8)	0,77 (0,65-0,86)
		IL-2 $^+$ /IFN- γ^+	>3	61,1 (35,7-82,7)	72,5 (58,3-84,1)	2,23 (1,2-4,0)	0,54 (0,3-1,0)	0,64 (0,52-0,75)
	CFP-10	IL-2 $^+$ total	>12	66,7 (41,0-86,7)	82,4 (69,1-91,6)	3,78 (1,9-7,4)	0,40 (0,2-0,8)	0,72 (0,60-0,82)
		IL-2 $^+$ /IFN- γ^-	>0	88,9 (65,3-98,6)	31,1 (19,1-45,9)	1,3 (1,0-1,7)	0,35 (0,09-1,4)	0,59 (0,46-0,70)
		IFN- γ^+ total	>6	83 (59-96)	67 (52-79)	2,5 (1,6-3,9)	0,25 (0,09-0,7)	0,73 (0,61-0,83)
		IL-2 $^-$ /IFN- γ^+	>5	83,3 (58,6-96,4)	74,5 (60,4-85,7)	3,27 (2,0-5,5)	0,22 (0,08-0,6)	0,74 (0,63-0,84)
		IL-2 $^+$ /IFN- γ^+	>1	88,9 (65,3-98,6)	58,8 (44,2-72,4)	2,16 (1,5-3,1)	0,19 (0,05-0,7)	0,75 (0,63-0,84)

LR+ – raportul de probabilitate pentru un test pozitiv; LR- – raportul de probabilitate pentru un test negativ; 95%ÎÎ – intervalul de încredere a de 95%

2.7 Sinteza și interpretarea rezultatelor aprecierii profilului citokinic $INF-\gamma$ IL-2

Acest studiu a evaluat valoarea adăugată a aprecierii IL-2 secretate de limfocitele T din sângele periferic în depășirea neajunsurilor testelor IGRA aplicate pentru discriminarea dintre diferite staturi clinice la infecție tuberculoasă. Rezultatele obținute au demonstrat un răspuns citokinic diferit al limfocitelor T la stimularea cu antigenele specifice ESAT-6 și CFP-10 la persoanele cu ITBL, bolnavii de tuberculoză și persoanele vindecate de tuberculoză. În același timp, variabilitatea răspunsului citokinic la nivelul persoanelor din același grup (caracterizate prin același statut al infecției tuberculoase) face dificilă discriminarea inechivocă dintre grupurile analizate. Sensibilitatea și specificitatea maximă pentru diagnosticul tuberculozei active a fost observată în cazul răspunsului $INF-\gamma^+$ apreciat prin IGRA-EliSpot. Aprecierea subpopulațiilor limfocitare secretoare de $IL-2^+$, INF^+ , $IL-2^+ INF^+$, prin FluoroSpot nu a oferit o mai bună diferențiere dintre statusurile clinice ale infecției cu *M. tuberculosis*.

În contextul datelor obținute trebuie remarcat gradul înalt de concordanță dintre numărul CMSP secretorii de $INF-\gamma^+$ determinat prin FluoroSpot și cel prin IGRA-EliSpot, confirmat și în alte studii de comparare a celor două tehnici diagnostice [228]. Din punct de vedere metodologic costumularea CD28 pe parcursul incubării peste noapte nu a determinat un număr crescut al răspunsurilor pozitive de fondal (CFP în probele de control negativ), iar numărul general de CFP determinat prin FluoroSpot a fost inferior celui prin IGRA-EliSpot. Analiza ROC a determinat numărul de 6 CMSP secretorii de $INF-\gamma^+$ și $IL-2^- INF-\gamma^+$ drept valoare prag pentru diferențierea dintre tuberculoza activă și ITBL sau boala vindecată. Această valoare este sub valoarea de 10 CFP recomandată de producător pentru a considera răspunsul citokinic pozitiv în FluorSpot.

Tehnica FluoroSpot permite detectare concomitentă la nivelul uneia și aceleași celule secreția de IL-2 și $INF-\gamma$ diferențiind trei subpopulații limfocitare cu fenotipuri citokinice diferite - $IL-2^+ INF-\gamma^-$, $IL-2^+ INF-\gamma^+$, $IL-2^- INF-\gamma^+$. Acestea corespund la 3 stadii diferite de diferențiere a limfocitelor T, respectiv limfocite T memorie centrale, limfocite T memorie efectorii și limfocite T diferențiate [229]. Aprecierea acestor populații limfocitare prin FluoroSpot a evidențiat un nivel semnificativ mai mare al limfocitelor $IL-2^- INF-\gamma^+$ la bolnavii de tuberculoză în comparație cu cei cu ITBL și cei vindecați de tuberculoză, fapt care confirmă rezultate obținute anterior prin citometrie în flux [230, 231]. Cu toate acestea suprapunerile semnificative în distribuția rezultatelor în grupurile studiate, nu ar permite diferențierea statutului clinic al infecției cu *M. tuberculosis* în fiecare caz împarte în practica clinică. Prin analiza ROC a fost stabilită valoarea prag a limfocitelor T secretorii de $INF-\gamma^+$ mai mare de 16 CFP/ 200.000 CMSP ca marker sugestiv pentru infecția tuberculoasă activă cu o sensibilitate de 89% și specificitate de 76%. În practica

clinică aceasta ar însemna că un rezultat mai mic de 16 CFP/ 200.000 CMSP exclude tuberculoza activă, cu o rată de 24% de rezultate fals pozitive printre persoanele cu ITBL sau cel cu tuberculoză vindecată. Astfel, diferențierea statutelor clinice ale infecției cu *M. tuberculosis* prin IGRA-EliSpot sau FluoroSpot în CMSP rămâne suboptimală.

Rezultatele altor studii conform cărora răspunsului imun limfocitar la persoanele care controlează eficient infecția cu *M. tuberculosis* (cele cu ITBL sau cele cu tuberculoză vindecată) este dominat de celule cu pattern citokinic IL-2⁺IFN- γ ⁺ sau IL-2⁺IFN- γ nu a fost confirmate în prezentul studiu [10, 226, 230, 232]. În același timp, chiar și datele anterior publicate, la care ne-am referit, nu sunt inechivoce. Astfel, unii autori raportează o diferențiere netă dintre persoanele cu tuberculoză activă, cele cu ITBL și cele vindecate în baza celulelor cu profil citokinic IL-2⁺IFN- γ ⁺, la stimularea cu derivatul proteic purificat (PPD, tuberculina), însă similar cu rezultatele noastre această concluzie nu este reproducibilă la stimularea cu ESTA-6 și CFP-10 [232]. Cu toate acestea în alte cazuri stimularea prin ESAT-6 și CFP-10 a permis diferențierea staturilor clinice studiate [10, 231]. Explicația cea mai la suprafață a acestor discrepante vine din diferențele procedurilor de laborator aplicate printre care: tehnologia de citire a rezultatelor (citometrie în flux, IGRA-ELISA, IGRA-EliSpot, FluroSpot), diverse kituri de antigeni și protocoale de procesare și incubare a probelor [233]. La fel, diferențele observate ar putea fi determinate de un grad diferit de expunere la micobacterii (în regiunile cu incidență înaltă a infecției comparativ cu cele cu incidență joasă), diferențe în încărcătura bacteriană la persoanele cu tuberculoză activă, astfel că statutul microscopic pozitiv se asociază cu reducerea răspunsului policitokinic limfocitar [234]. În plus variațiile ar putea fi determinate de diferențe în potența răspunsului imun la diferite persoane. În tentativa de a minimaliza acest factor în prezentul studiu fiecare pattern de răspuns citokinic a fost exprimat ca proporție a întregului spectru de pattern-uri citokinice apreciate (IL-2⁺IFN- γ , IL-2⁺IFN- γ ⁺, IL-2⁺IFN- γ ⁺). În una dintre publicațiile similare, această abordare a permis îmbunătățirea puterii de discriminare dintre diversele statute clinice ale infecției tuberculoase, rezultat care nu a fost reprodus și în prezenta lucrare [226].

Interpretarea datelor prezentate în acest subcapitol trebuie făcută prin prisma a două limite importante, care nu au putut fi depășite la momentul realizării studiului. Prima este dată de imposibilitatea aprecierii răspunsului IL-2 și prin tehnica IGRA-EliSpot, iar cea de a doua - de neaprecierea răspunsului citokinic și prin stimularea cu PPD, fapt care ne-ar permite o comparație mai bună cu rezultatele publicate în alte lucrări de acest tip.

2.8 Concluzii la capitolul 2

1. Corelarea rezultatelor aprecierii în sângele periferic a răspunsul citokinic celular (secreția de IFN- γ) la stimularea cu antigene micobacteriene specifice prin IGRA-EliSpot și Fluorospot a pus în evidență o concordanță bună a rezultatelor determinate prin ambele tehnici.

2. Nivelul limfocitelor T cu profil citokinic IL-2-IFN- γ^+ , este crescut la bolnavii cu tuberculoză activă comparativ cu persoanele cu ITBL sau cele cu tuberculoză vindecată și acesta poate fi ușor și cu o acuratețe înaltă determinat prin FluoroSpot.

3. O diferențiere mai bună între statusurile infecției tuberculoase apreciate în baza profilului secretor al limfocitelor T (IL-2-IFN- γ^+ , IL-2⁺IFN- γ^- , IL-2⁺IFN- γ^+) din sângele periferic a fost observat la stimularea cu antigenul specific CFP-10 comparativ cu ESAT-6.

4. Aprecierea concomitentă a profilului secretor IL-2 INF- γ al limfocitelor T din sângele periferic (IL-2-IFN- γ^+ , IL-2⁺IFN- γ^- , IL-2⁺IFN- γ^+) atât în valoare absolută cât și relativă nu permite o discriminare fiabilă a statusurilor ale infecției tuberculoase în practica clinică.

3. OPTIMIZAREA DIAGNOSTICULUI MICROSCOPIC AL INFECȚIEI TUBERCULOASE

Chiar și în era tehnicilor molecular genetice de diagnostic al infecției cu *M. tuberculosis* microscopia continuă a fi o metodă pe larg utilizată atât în stabilirea diagnosticului cât și în monitorizarea microbiologică a eficacității tratamentului. Efectuarea examinărilor microscopice de calitate este laborioasă implicând timp și personal de laborator calificat. Aceasta face ca volumul mare de examinări microscopice frecvent să constituie o provocare importantă în laboratoarele de nivel secundar sau terțiar, personalul cărora ar trebui să fie implicat prioritar în examinările pe bază de cultură sau testele molecular genetice complexe. În acest context aplicarea tehnologiilor automatizate (robotizate) de citire a rezultatelor microscopiei, ar putea asigura examinarea unui număr mare de frotiuri cu implicarea unui număr minimal de personal. Aceasta poate contribui la eficientizarea examenului microscopic atât la nivelul laboratoarelor de nivel secundar și terțiar, precum și în cele de la nivelul primar (prin citirea la distanță a imaginilor digitale a frotiurilor obținute în cabinetele de microscopie). Un astfel de sistem de citire automatizată a frotiurilor în colorație cu auramină examinate prin microscopie LED (*ultrabright light emitting diode*) este sistemul Fluorobot (ConsultASK Ltd., Budapesta, Hungaria). În acest capitol sunt prezentate rezultate evaluării acurateței de detectare a bacililor acido-alcool rezistenți în frotiurile de spută la examinarea prin Fluorobot la persoanele suspecte de tuberculoză.

3.1 Material și metodă

Mediul de realizare a cercetării

Pentru realizarea obiectivului propus a fost realizat unui studiu prospectiv de apreciere a acurateței diagnostice a sistemului Fluorobot în probele de spută colectate de la bolnavii cu afecțiuni respiratorii examinați în clinica Institutului de ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc" (IFP) Chișinău, Republica Moldova. Examenul microbiologic al probelor de spută a fost efectuat în Laboratorul național de referință de în micobacteriologia tuberculozei (LNR) din aceeași instituție. IFP este o instituție medicală de nivel terțiar, care servește în calitate de centru de referință pentru bolnavii cu boli respiratorii din întreaga republică, iar LNR este un laborator de referință pentru sistemul de diagnostic microbiologic al tuberculozei din Republica Moldova. LNR efectuează spectrul deplin de investigații microbiologice pentru *M. tuberculosis* pentru bolnavii consultați în IFP, precum și servicii de sputocultură și sensibilitate la medicamente pentru bolnavii examinați în municipiul Chișinău, raionale din zona de sud și o parte dintre raioanele din zona de centru a Republicii Moldova.

Colectarea și procesarea probelor de spută

Colectarea probelor de spută a fost realizată ca parte integrală a procedurilor de rutină de colectare a sputei din IFP. Astfel, în cadrul studiului au fost analizate probele de spută colectate consecutiv de la toți pacienții adulți examinați cu simptome respiratorii în cadrul IFP în perioada septembrie - decembrie 2016. În cadrul studiului au fost analizate probele de spută examinate în scop diagnostic, cele colectate în scop de monitorizare a tratamentului antituberculos nu au fost parte a acestei cercetări. Specimenele biologice altele decât sputa nu au fost incluse în studiu.

Anterior procesării ulterioare probele de spută recepționate la LNR a fost supuse decontaminării (metoda NALC-NaOH) în conformitate cu procedura standard în vigoare [235]. Din sedimentul sputei procesate au fost pregătite și colorate cu auramină frotiurile care au fost supuse examinării microscopice ulterioare. Sedimentul restant din sputa procesată din fiecare probă a fost utilizat pentru cultură pe mediu lichid (BACTEC MGIT 960; BD, Sparks, MD) și solid (Lowenstein-Jensen). Cultura sputei a fost utilizată în calitate de standard de referință pentru determinarea acurateții diagnostice a examinării microscopice (manuală și robotizată). Proba a fost considerată cu cultură pozitivă dacă cel puțin una dintre culturi fie lichidă fie solidă a fost pozitivă. Probele de spută cu culturi contaminate sau incerte au fost excluse.

Frotiurile pentru microscopia fluorescentă și cultivarea pe mediile lichide și solide au fost efectuate în conformitate cu procedurile operaționale standard ale LNR [90, 235], care corespund recomandărilor Global Laboratory Initiative [236]. Confirmarea *M. tuberculosis* în culturile pozitive a fost efectuată prin demonstrarea bacililor acid-alcool rezistenți în colorației Ziehl-Neelsen și testul rapid la antigenul MPT64 (BD Microbiology systems, Sparks, USA).

Examinarea microscopică a frotiurilor de spută

Fiecare dintre frotiurile analizate a fost examinat de către un microscopist experimentat (cu experiență de peste 30 de ani) precum și cu ajutorul Fluorobot-ului. Inițial examinarea a fost efectuată de către microscopist, fără cunoașterea rezultatelor citirii prin Fluorobot.

La examinarea manuală lamelele au fost examinate cu mărirea x20, iar la examinarea prin Fluorobot cu mărirea x26, în ambele cazuri nefiind aplicată emersiunea cu ulei. Frotiurile au fost gradate în +/-, 1+, 2+ și 3+ în conformitate cu recomandările Global Laboratory Initiative [236]. Toate frotiurile gradate ca +/- la citirea manuală au fost evaluate suplimentar de un al doilea microscopist, iar rezultatul examinării în cazurile divergente a fost decis prin consens.

Caracteristicile Fluorobotului

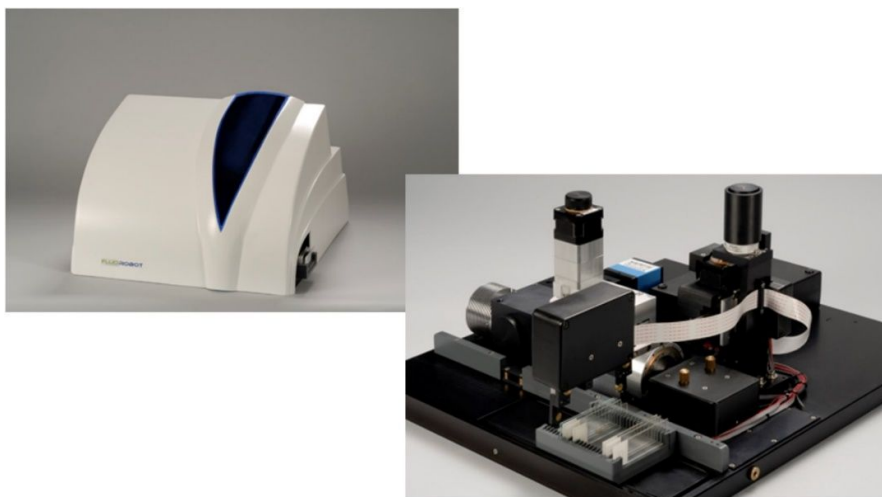
Fluorobotul reprezintă un sistem computerizat de examinare microscopică care posedă un sistem integrat de citire și detectare a bacililor acido-alcoolo rezistenți în frotiurile colorate cu auramină (**Figura 3.1**). Examinarea frotiurilor prin Fluorobot include următoarele etape consecutive: a) autofocusre; b) obținerea imaginilor; c) filtrarea imaginilor; d) setarea numărului de câmpuri care urmează să fie vizualizate. Numărul prestabilit de câmpuri vizualizate este de 100 (cu mărirea x26), aceasta corespunde cu o suprafață de 2 mm² [237]. Conform acelorași recomandări în cazul unui număr de bacili acido-alcoolo rezistenți în frotiul examinat ce corespunde gradației 2+ citirea este oprită la 40 de câmpuri vizuale, iar în caz de 3+ la 20; e) detectarea câmpurilor vizuale de interes (CVI); f) determinarea parametrilor morfologici; g) clasificarea CVI identificate în baza algoritmilor de *deep learning algorithm* însușiți în baza unei colecții de 100.000 de frotiuri microscopice pozitive și un număr similar de frotiuri negative.

Sistemul Fluorobot utilizează lamele oferite de producător Consultask Ltd, care au marcaje speciale care permit autofocusarea, în special în cazul frotiurilor negative. Frotiurile cu 0-1 bacili în CVI sunt considerate negative, iar frotiurile pozitive sunt gradate +/- (2-9 bacili per CVI), 1+ (10-99 bacili per CVI) 2+ (100-1000 bacili per CVI), 3+ (mai mult de 1000 bacili per CVI).

Analiza statistică

Analiza statistică pentru această parte a lucrării a fost efectuată cu ajutorul programului MedCalc Statistical Software versiunea 19.0.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

Parametrii de acurateță diagnostică (sensibilitatea, specificitatea, valoare predictivă negativă, valoare predictivă pozitivă, raportul de probabilitate pentru un test pozitiv și raportul de probabilitate pentru un test negativ) au fost raportate cu intervalele de încredere de 95% (95%ÎÎ). Performanțele examinării manuale și prin Fluorobot a frotiurilor de spută a fost comparate prin contrapunerea ariilor de sub curbă (AUC) în analiza ROC. Concordanța dintre rezultatele Fluorobotului și a examinării manuale a fost măsurată prin procentul diferențelor simetrice dintre două rezultate gradate pozitiv sau negativ, definită ca proporția de divergență și rata de discrepanță majoră (mai mult de un grad diferență) dintre gradațiile de același rang (negativ, +/-, 1+, 2+, 3+) obținute prin cele două metode.



A

B

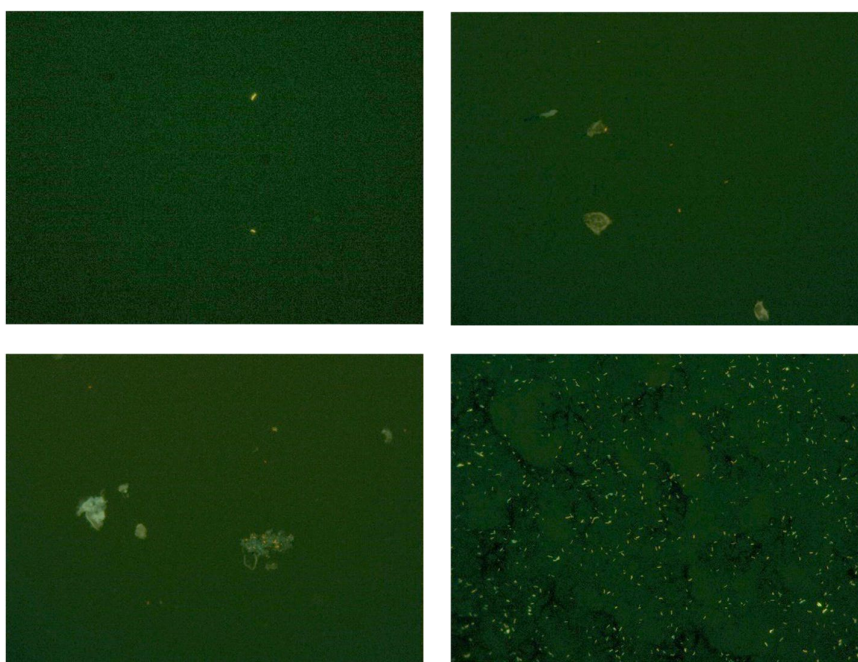


Figura 3.1. A. Fluorobot dispozitiv pentru examinarea automatizată a frotiurilor pentru examenul microscopic colorate fluorescent cu auramină. B. Vizualizarea frotiurilor cu diferit grad de pozitivitate în colorație fluorescentă

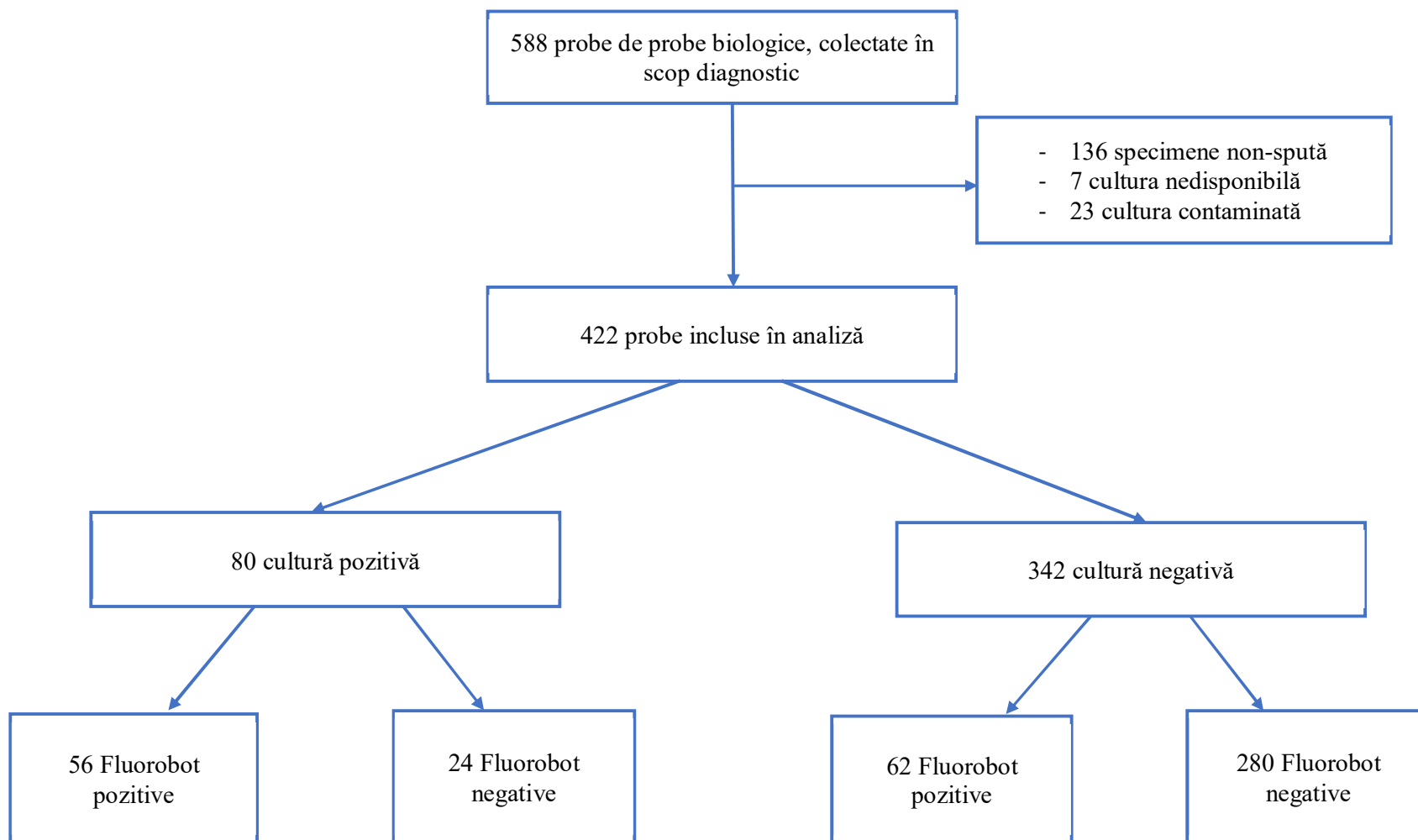


Figura 3.2. Identificarea și selectarea probele de spută analizate în studiu

3.2 Caracteristica probelor analizate

În cadrul studiului au fost recepționate de către LNR 997 de specimene biologice. Dintre acestea 588 au fost obținute în scop diagnostic de la pacienții cu simptome respiratorii, celelalte probe au fost colectate cu scop de monitorizare a tratamentului tuberculos și au fost excluse din analiză. Dintre probele diagnostice 136 au fost specimene altele decât sputa motiv din care nu au fost incluse în studiu, iar în cazul la altele 30 au fost obținute culturi contaminate fapt care a determinat excluderea și acestora. Astfel, în analiza finală au fost incluse 422 de probe de spută (**Figura 3.2**). Cultura la *M. tuberculosis* a fost pozitivă în 80 (18,9%) dintre probele analizate.

3.3 Rezultatele examinării manuale și prin Fluorobot a frotiurilor în colorație fluorescentă

La examinarea manuală au fost gradate ca pozitive 56 dintre 80 de probe cu cultură pozitivă, ceea ce corespunde unei sensibilități de 70,0% (95%ÎÎ, 58,7% - 79,7%). În cazul probelor de spută cu cultură negativă 335 din 342 de probe au fost apreciate cu rezultat negativ al microscopiei, ceea ce corespunde unei specificități de 97,9% (95%ÎÎ, 95,8% - 99,2%).

Fluorobotul a apreciat ca pozitive rezultatele microscopiei a 56 dintre 80 de probe cu cultură pozitivă ceea ce corespunde sensibilității de 70,0% (95%ÎÎ, 58,7% - 79,7%). Dintre 342 de probe cu cultură negativă rezultat microscopic negativ, la examinarea prin Fluorobot, a fost înregistrat în cazul a 280 de probe, ceea ce corespunde unei specificități de 81,8%, (95%ÎÎ, 77,4% - 85,8%, **Tabelul 3.1**).

Raportul de probabilitate pentru un test pozitiv (LR+) și raportul de probabilitate pentru un test negativ (LR-) în cazul citirii manuale a constituit respectiv 34,2 (95%ÎÎ, 16,2-72,2) și 0,4 (95%ÎÎ 0,2-0,4), iar acestea pentru examinarea prin Fluorobot 3,9 (3,0-5,0) și 0,4 (0,3-0,5), respectiv. Astfel, un rezultat pozitiv prin Fluorobot are o probabilitate de 8,5 ori mai mică de a confirma diagnosticul de tuberculoză decât în cazul examinării manuale a frotiurilor de spută în colorație fluorescentă.

În contextul demonstrării specificității mai reduse la examinarea prin Fluorobot au fost comparată gradarea fiecărui frotiu prin ambele metode și au fost identificate 66 de frotiuri apreciate ca +/- de către Fluorobot, dar negative la citirea manuală (**Tabelul 3.2**). Astfel, pentru a reduce rata rezultatelor fals pozitive și a crește specificitatea examinării prin Fluorobot a fost evaluată reexaminare unor frotiuri prin examinare manuală. Pentru a determina numărul minim de frotiuri, reevaluarea cărora ar putea determina o creștere optimală a specificității examinării prin

Tabelul 3.1. Acuratețea diagnostică a examinării manuale și prin Fluorobot a frotiurilor de spută în colorație fluorescentă

	Sensibilitatea % 95%ÎÎ	Specificitatea % 95%ÎÎ	VPP % 95%ÎÎ	VPN % 95%ÎÎ	LR+ 95%ÎÎ	LR- 95%ÎÎ
Examen manual	70,0 58,7 - 79,7	97,9 95,8 - 99,2	88,9 79,1 - 94,4	93,3 90,9 - 95,1	34,2 16,2 - 72,2	0,40 0,2 - 0,4
Fluorobot	70,0 58,7 - 79,7	81,9 77,4 - 85,8	47,5 40,9 - 54,1	92,1 89,3 - 94,2	3,9 3,0 - 5,0	0,40 0,3 - 0,5

Tabelul 3.2. Acuratețea diagnostică a examinării prin Fluorobot cu reevaluare manuală frotiurilor slab pozitive

Intervalul reevaluat*	Sensibilitatea % 95%ÎÎ	Specificitatea % 95%ÎÎ	VPP % 95%ÎÎ	VPN % 95%ÎÎ	LR+ 95%ÎÎ	LR- 95%ÎÎ	Frotiuri reevaluate n (%)
9-2	61,3 49,7- 71,9	99,1 97,5 - 99,8	94,2 83,9 - 98,1	91,6 89,3 - 93,5	69,8 22,3 - 218,3	0,39 0,30 - 0,51	81 (19,2)
8-2	62,5 51,0 - 73,1	98,8 97,0 - 99,7	92,6 82,3 - 97,1	91,8 89,5 - 93,7	53,4 19,9 - 143,7	0,38 0,29 - 0,50	77 (18,2)
7-2	62,5 51,0 - 73,1	98,8 97,0 - 99,7	92,6 82,3 - 97,1	91,8 89,5 - 93,7	53,4 19,9 - 143,7	0,38 0,29 - 0,50	77 (18,2)
6-2	62,5 51,0 - 73,1	98,5 96,6 - 99,5	90,9 80,5 - 96,0	91,8 89,4 - 93,7	42,7 17,6 - 103,7	0,38 0,29 - 0,50	76 (18,0)
5-2	62,5 51,0 - 73,1	97,7 95,4 - 98,9	86,2 75,5 - 92,7	91,8 89,4 - 93,7	26,7 13,2 - 54,1	0,38 0,29 - 0,51	70 (16,6)
4-2	63,8 52,2 - 74,2	96,2 93,6 - 98,0	79,7 69,2 - 87,3	91,9 89,4 - 93,8	16,8 9,6 - 29,3	0,38 0,28 - 0,50	63 (14,9)
3-2	63,8 52,4 - 74,2	91,8 88,4 - 94,4	63,8 54,5 - 72,1	91,8 89,3 - 93,7	12,1 7,5 - 19,6	0,38 0,29 - 0,51	54 (12,8)
2	65,0 53,2 - 75,3	90,6 87,1 - 93,5	61,9 53,0 - 70,1	91,7 89,1 - 93,7	6,9 4,8 - 10,0	0,39 0,29 - 0,52	38 (9,0)
1	72,5 61,4 - 81,9	81,9 77,4 - 85,8	48,3 41,8 - 54,9	92,7 89,9 - 94,8	4,0 3,1 - 5,2	0,33 0,23 - 0,48	81 (19,2)

VPP- valoarea predictivă pozitivă, VPN - valoarea predictivă negativă, 95%ÎÎ - intervalul de încredere 95% , LR+ - raportul de probabilitate pentru un test pozitiv, LR- - raportul de probabilitate pentru un test negativ. *- numărul de bacili detectați prin Fluorobot;

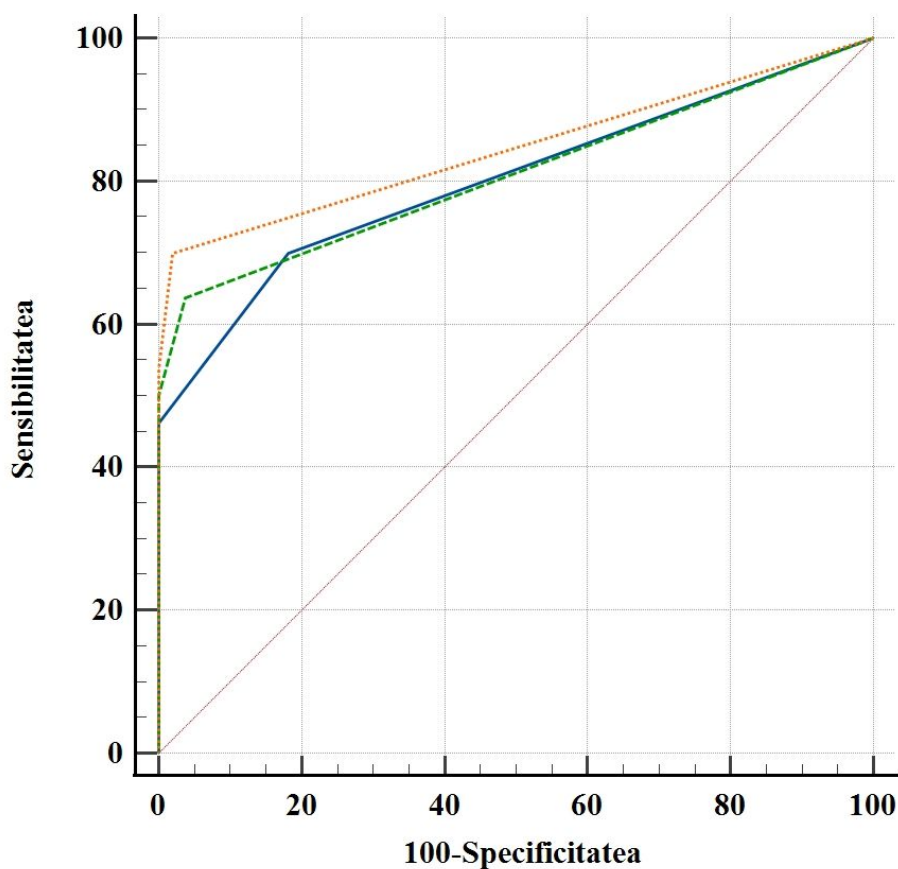


Figura 3.3. Acuratețea diagnostică a examinării prin Fluorobot a frotiurilor de spută în colorație fluorescentă cu auramină comparativ cu examinarea manuală de către specialiștii de laborator, cultura pe medii de cultură solidă considerată metodă de referință, linia oranj - examinarea manuală (AUC 0,84; 95%ÎÎ 0,81 - 0,87), linia verde - examinarea prin Fluorobot complementată cu examinarea manuală a frotiurilor incerte (AUC - 0,81; 95%ÎÎ 0,77 - 0,85), linia albastră examinare doar prin Fluorobot (AUC - 0,80; 95%ÎÎ 0,76 - 0,84).

Fluorobot, au fost examinate câteva opțiuni în dependență de numărul de bacili identificați în frotiu. Un rezultat acceptabil, din perspectiva numărului de frotiuri reexamine versus valoarea adăugată la specificitate a fost obținut în cazul reexaminării frotiurilor cu 2-4 bacili în CVI. Acest subgrup a constituit 63 (14,9%) de frotiuri din totalul frotiurilor analizate, reexaminarea cărora a determinat ca rezultatul microscopiei să fie pozitiv în 51/80 dintre probele de spută cu cultură pozitivă (sensibilitatea 63,8%, 95%ÎÎ, 52.2 - 74.2), iar rezultatul negativ al microscopiei a fost determinat în 329 dintre 342 de probe de spută cu cultură negativă (specificitatea 96,2%, 95%ÎÎ,

93,6 – 98,0). În acest caz valorile corespunzătoare ale LR+ și LR- au fost 16,8 (9,6-29,3) și 0,38 (0,28-0,50). O acuratețe diagnostică și mai înaltă poate fi obținută prin reexaminarea unui număr mai mare de frotiuri (**Tabelul 3.2**).

Valoarea AUC pentru examinarea prin Fluorobot a constituit 0,80 (95%ÎÎ 0,76 - 0,84), pentru examinarea prin Fluorobot și reexaminarea a unui set complementar de frotiuri (cu 2 - 4 bacili) - 0,81 (95%ÎÎ, 0,77-0,85), iar pentru examinarea manuală - 0,84 (95%ÎÎ 0,81 - 0,88) (**Figura 3.2**). Diferențele dintre valorile AUC înregistrate sunt minimale și statistic ne semnificative ($AUC_{\text{manuală}} - AUC_{\text{Fluorobot}} = 0,044$, $p=0,07$; $AUC_{\text{manuală}} - AUC_{\text{Fluorobot parțial reexaminat}} = 0,036$; $p = 0,06$).

3.4 Compararea gradării încărcăturii bacteriene apreciată manual versus Fluorobot

Diferențele simetrice dintre aprecierea prin Fluorobot și aprecierea manuală a constituit 18,2%, iar dintre Fluorobot parțial reexaminat și aprecierea manuală 5,6% (**Tabelul 3.3**). Rata discrepanțelor majore a constituit 0,7% atât pentru aprecierea izolată prin Fluorobot și reexaminare suplimentară comparate cu examinarea manuală.

Tabelul 3.3. Concordanța dintre gradarea manuală și prin Fluorobot

Numărul de bacili detectați		Gradarea manuală					% diferențelor simetrice	Rata discrepanțelor majore
		Negativ	Slab pozitiv	1+	2+	3+		
Fluorobot	0-1	293	11	0	0	0	18,2%	0,7%
	2-9	66	9	5	1	0		
	10-99	0	0	9	0	2		
	100-999	0	0	1	13	2		
	>1000	0	0	0	0	10		
Fluorobot cu reevaluarea frotiurilor cu 2-4 bacili	0-1	347	11	0	0	0	5,4%	0,7%
	2-9	12	9	2	1	0		
	10-99	0	0	12	0	2		
	100-999	0	0	1	13	2		
	>1000	0	0	0	0	10		

3.5 Sinteza și interpretarea rezultatelor citirii robotizate a frotiurilor microscopice

În urma evaluării performanțelor diagnostice a citirii automatizate prin Fluorobot a frotiurilor de spută colorate fluorescent cu auramină a fost stabilit că aceasta poate oferi o specificitate și rată de probabilitate a testului pozitiv mai joasă decât la citirea manuală (efectuată de o persoană experimentată, cu un stagiul de peste 30 de ani de examinare a frotiurilor microscopice). Cu toate acestea acuratețea diagnostică a Fluorobotului poate fi crescută până la cea a examinării manuale, prin reevaluarea a unei părți dintre frotiurile gradate ca slab pozitive (+/-).

Citirea robotizată a frotiurilor microscopice poate contribui la perfecționarea diagnosticului infecției tuberculoase, în special în laboratoare care procesează și examinează un număr mare de probe biologice. Sistemele automatizate de interpretarea a imaginilor microscopice oferă o citire standardizată și fiabilă a imaginilor microscopice cu o potențială reducere a timpului de obținere a rezultatelor pentru luarea deciziilor clinice ulterioare. Sistemele automatizate ar putea ușura obținerea unor rezultate reproductibile de înaltă calitate a examinărilor microscopice care nu sunt influențate de nivelul de calificare sau gradul de oboseală a personalului de laborator. Utilizarea tehnologiilor robotizate de obținere și citire a imaginilor microscopice ar putea facilita și acțiunile aferente verificării controlului calității. În acest scop imaginile microscopice obținute și stocate în Fluorobot pot fi transmise la un centru de evaluare externă, eliminând necesitatea transmiterii fizice a frotiurilor sau vizetelor personale în laboratorul evaluat [7, 238].

Organizația mondială a sănătății (OMS) admite utilizarea microscopiei sputei în screening-ul tuberculozei în cazul inaccesibilității testelor moleculare de tipul celor Xpert MTB/Rif. La fel, microscopia continuă a fi un test important pentru monitorizarea răspunsului microbiologic în tratamentul tuberculozei, în special în zonele cu incidență înaltă a bolii unde cultura nu este aplicată în acest scop (de regulă pe motivul costurilor). Programele de răspuns la tuberculoză din aceste regiuni frecvent se confruntă cu lipsa de personal de laborator calificat [239, 240]. Fluorobotul, datorită implicării unui număr minimal de persoane calificate, poate soluționa problema suprasolicitării în centrele cu deficit de personal și/sau un flux sporit de probe biologice.

Utilizat în calitate de test de sine stătător Fluorobotul a demonstrat o sensibilitate similară cu cea obținută la examenul efectuat de către un microscopist foarte experimentat, însă cu specificitate mai redusă (~82%). Cu toate acestea creșterea semnificativă a specificității poate fi obținută prin reevaluarea unui părți relativ mici de frotiuri (~15%), în acest caz specificitatea atinge valori comparabile cu cea a examinării manuale. Pentru a simplifica o eventuală reevaluare manuală, selectarea imaginilor în acest scop ar putea fi automatizată, iar reevaluarea s-ar putea limita doar la 4 câmpuri vizuale. Confirmarea manuală nu impune prezența fizică a

microscopistului, dat fiind faptul că la necesitate pentru confirmare imaginile digitale pot fi transmise la distanță în format electronic. La fel, în cadrul unui algoritm de screening sau de diagnostic aceste frotiuri ar putea fi confirmate prin aplicarea unui test cu sensibilitate înaltă precum este Xpert Mtb/Rif. Integrarea evaluării robotizate a frotiurilor microscopice în cadrul unui astfel de algoritm poate contribui la reducerea numărului de probe care ar necesita evaluare prin Xpert Mtb/Rif, astfel reducându-se costurile diagnosticării bolii în cadrul programelor naționale de răspuns la tuberculoză. În viitor specificitatea Fluorobotului ar putea fi sporită prin ”învățarea” *software* dispozitivului pe o bibliotecă mai largă de imagini microscopice și eventuala îmbunătățire a părților fizice precum camera video, obiectivele sau filtrele aplicate.

Microscopia continuă a fi frecvent utilizată în scopul monitorizării microbiologice a tratamentului tuberculozei [145]. Deși performanțele Fluorobotului în acest scop nu au fost evaluate în acest studiu, gradul înalt de concordanță dintre Fluorobot și citirea manuală, în cazul frotiurilor cu un grad înalt de pozitivitate (1+ - 3+), conferă optimism în ceea ce privește utilizarea Fluorobotului în acest scop.

Pe lângă avantajele oferite de utilizarea unui astfel de dispozitiv precum este Fluorobotul, implementarea în diverse sisteme medicale a acestei tehnologii ar putea întâlni o serie de obstacole. Printre aceste disponibilitatea unei surse stabile de alimentare cu energie sau lipsa consumabilelor sunt printre cele mai probabile în regiunile cu resurse financiare limitate. Reducerea calificării, abilităților personalului uman în citirea calitativă a frotiurilor microscopice ar putea fi o altă problemă, care s-ar putea ivi la o anumită etapă a implementării pe termen lung. La fel, trebuie admis faptul că costurile asociate aplicării Fluorobotului ar putea fi mai mari decât în cazul citirii manuale, cel puțin în unele zone geografice. Cu toate acestea investițiile, cel puțin cele inițiale, legate de implementarea Fluorobotului sunt estimate ca să fie comparabile cu prețul unui microscop performant cu destinație generală, iar potențialele economii făcute pe seama implicării unui număr mai mic de personal ar putea echilibra balanța cost-eficacitate pe termen lung. O evaluare de cost eficacitatea ar fi rațională anterior implementării în fiecare sistem medical în parte.

Datele prezentate trebuie interpretate din perspectiva următoarelor limitări: realizarea studiului într-un singur laborator cu standarde înalte de calitate a examinării microscopice; imposibilitatea de a stratifica rezultatele sputei după statutul HIV al bolnavilor, variabilă care ar putea influența rezultatul examinării microscopice; excluderea populației pediatrice din analiza efectuată nu ne permite generalizarea rezultatelor obținute și în această categorie de vârstă.

3.6. Concluzii la capitolul 3

1. Citirea automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu auramină cu ajutorul dispozitivului Fluorobot oferă parametri de sensibilitate similari și specificitate moderat mai reduși comparat cu cei obținuți la citirea manuală de către un microscopist înalt experimentat.

2. Specificitatea citirii automatizate a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu auramină prin Fluorobot poate fi crescută până la volari similare cu cea obținută la citirea de către personalul uman prin reevaluarea manuală a unui număr de frotiuri apreciate ca slab pozitive la citirea automatizată (până la 15% dintre frotiurile examinate), iar pe viitor ameliorarea acurateții diagnostice ar putea fi obținută prin perfecționarea componentelor optice și software ale dispozitivului.

3. Corelarea rezultatelor determinării gradării încărcăturii bacteriene, exprimate prin gradul de pozitivitate a sputei examinate, determinate prin citirea automatizată prin Fluorobot și cea prin citire manuală a evidențiat o concordanță bună dintre acestea.

4. Aplicarea Fluorobotului în condițiile unui laborator înalt specializat cu un volum și flux sporit de specimene analizate a demonstrat fezabilitatea utilizării acestuia în practica curentă.

4. TEHNICI DE DIAGNOSTIC MOLECULAR-GENETIC ȘI SPECIMENE ALTERNATIVE

4.1 Impactul implementării testării prin Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice la bolnavii cu tuberculoză MDR

Accesul universal la testele de diagnostic al tuberculozei și cele de apreciere a sensibilității la medicamente (TSM) este printre elementele cheie ale strategiei END TB. Aceasta din urmă este implementată de către OMS având drept scop declinul epidemiei de tuberculoză la nivel global. Accesibilitatea testelor de diagnostic este esențială pentru diagnosticul precoce al tuberculozei și inițierea unui tratament corespunzător. În acest sens deosebit de importante sunt testele care permit confirmarea rapidă a pattern-ului MDR al *M. tuberculosis*, caz în care se impune o abordare terapeutică principial diferită decât în cazul tuberculozei sensibile la medicamente. Din păcate metodele TSM bazate pe cultură se caracterizează prin obținerea rezultatelor doar după mai multe săptămâni de la colectarea specimenelor biologice relevante, perioadă în care un pacient cu tuberculoză MDR ar putea fi expus unui tratament inefficient și cu un înalt potențial de reacții adverse. O modificare cardinală a acestei situații a fost întrezărită odată cu creșterea accesului, inclusiv în practica clinică curentă din țările cu venituri reduse, la testele de depistare a infecției cu *M. tuberculosis* pe bază de amplificare a acizilor nucleici (teste molecular-genetice). Acestea pot confirma infecția tuberculoasă și aprecia sensibilitatea față de unele medicamente antituberculoase de referință în 24-48 de ore din momentul inițierii procesării probei în laborator [241].

Xpert MTB/Rif este un test comercial pe bază reacției de polimerizare în lanț (PCR) cu performanțe înalte de identificare a *M. tuberculosis* (deși cu unele variații în anumite grupuri de bolnavi) și de apreciere a sensibilității la rifampicină. La finele anului 2010 OMS a aprobat testul Xpert MTB/Rif pentru identificarea rapidă a *M. tuberculosis* și a rezistenței la rifampicină, decizie după care tehnologia a început să fie pe larg implementată în cele mai diverse regiuni geografice. Interesul deosebit de mare pentru implementarea tehnologiei a fost determinat inclusiv de caracteristicile tehnice ale metodei, care permit aplicarea testului și la nivelul primar de acordare a asistenței medicale. Acest aspect ar fi trebuit să aibă un impact major asupra reducerii timpului diagnostic și a timpului de inițiere a tratamentului la bolnavii cu tuberculoză, în special al celor MDR.

În Republica Moldova implementarea metodei Xpert MTB/Rif a început în anul 2012, inițial doar în câteva raioane pilot, cu extinderea graduală pe parcursul anilor 2012-2014 la scara întregii țări. Astfel, la finele perioadei de implementare majoritatea covârșitoare a bolnavilor

beneficiau de examinare prin Xpert MTB/Rif. În prezentul capitol este analizat impactul aplicării la scară națională a testării prin Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova.

4.1.1. Material și metodă

Design-ul studiului

A fost efectuat un studiu de pre-post implementare, cu volum de eșantion integral, pentru a aprecia impactului utilizării testului Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice în cazurile de tuberculoză MDR în Republica Moldova. În acest scop a fost comparat timpul de întârziere terapeutică (la nivel național) în anul 2011, anul care a precedat implementarea Xpert MTB/Rif, cu cel înregistrat în următorii 4 ani (2012-2015), perioadă în care numărul de teste Xpert MTB/Rif efectuate a crescut progresiv până la acoperirea majorității covârșitoare de persoane examinate cu supoziție clinică de tuberculoză. În cadrul studiului timpul de întârziere terapeutică a fost definit ca timpul dintre diagnosticarea tuberculozei (până la confirmarea pattern-ului de rezistență) și inițierea tratamentului pentru tuberculoza MDR.

Cadrul de studiu

În Republica Moldova depistarea cazurilor de tuberculoză combină intervențiile de depistare pasivă la persoanele simptomatice, care sau adresat de sine stătător la medic și intervențiile de depistare activă a bolii (screening-ul sistematic) în grupurile cu risc de îmbolnăvire. Bateria de teste standarde aplicate în diagnosticul tuberculozei pulmonare includ radiografia cutiei toracice, microscopia sputei la BAAR, Xpert MTB/Rif, cultura pentru *M. tuberculosis* urmată de TSM la medicamentele antituberculoase de linia întâi. Complementar, în cazul bolnavilor de tuberculoză cu rezistență la rifampicină sau MDR este efectuat TSM și la medicamentele antituberculoase de linia a doua. Examinările microbiologice aferente diagnosticării tuberculozei sunt efectuate în cadrul rețelei naționale de laboratoare specializate în micobacteriologie care include: la nivelul primar - 59 de centre de microscopie, la nivel secundar - 3 laboratoare regionale cu capacități de efectuare a culturii și TSM, iar la nivel terțiar Laboratorul național de referință în micobacteriologia tuberculozei (LNR). Prin intermediul Programului național de răspuns la tuberculoză tratamentul antituberculos este oferit gratuit tuturor bolnavilor de tuberculoză. Tratamentul la bolnavii cu tuberculoză sensibilă este prescris de către medicul pneumoftiziolog care a diagnosticat cazul de tuberculoză. În cazul bolnavilor cu tuberculoză MDR, tratamentul este prescris de către Comitetul național de management al cazului de tuberculoză MDR (CMDR). Acesta din urmă are întruniri cel puțin o dată pe săptămână. Între diagnosticarea tuberculozei și

confirmarea pattern-ului MDR al tulpinii implicate poate trece o durată variabilă de timp (condiționată în mare parte de metodele de TSM aplicate). În cazul când această perioadă este una mai îndelungată (de câteva săptămâni), în lipsa altor argumente privitor la probabilitatea înaltă a rezistenței MDR, bolnavul de tuberculoză va primi tratament pentru tuberculoza sensibilă. La testarea prin Xpert MTB/Rif decizia despre inițierea tratamentului pentru tuberculoza MDR este luată în baza confirmării rezistenței față de rifampicină prin Xpert MTB/Rif, iar la obținerea rezultatelor mai extinse ale TSM (de regulă a celor pe bază de culturi pe medii lichide MGIT), schema inițială de tratament poate fi ajustată în dependență de profilul de rezistență identificat.

Colectarea datelor primare

Datele anonimizate a tuturor bolnavilor diagnosticați cu tuberculoză MDR în Republica Moldova în perioada 2011-2015 au fost extrase din Sistemul informațional de monitorizare a tuberculozei (SIME-TB). În acesta sunt sistematic înregistrate toți pacienții diagnosticați cu tuberculoză în Republica Moldova. Pentru obiectivele studiului au fost selectate variabilele care descriu caracteristicile demografice de bază, confirmarea microbiologică a diagnosticului de tuberculoză și inițierea tratamentului antituberculos din compartimentul F090 a SIME-TB.

Analiza statistică

Variabilele analizate au fost prezentate ca mediane cu intervalul dintre cuartile. Pentru aprecierea asocierii dintre implementarea Xpert MTB/Rif și timpul de întârziere terapeutică a fost calculat coeficientul de corelație a lui Pearson (R) și coeficientul de regresie liniară (R^2). Statistic semnificative au fost considerate valorile p mai mici de 0,05. Calculele aferente analizei statistice au fost efectuate în programul GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

4.1.2. Dinamica testării prin Xpert MTB/Rif în perioada de studiu

În perioada de studiu în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză a fost implementat și a crescut progresiv numărul de teste Xpert MTB/Rif efectuate. În primul an de implementare a tehnicii au fost puse în aplicație treizeci de mașini, în următorul an fiind achiziționate suplimentar alte 5 mașini. Funcționalitatea maximă a echipamentului instalat a fost atinsă la finele celui de la doilea an de implementare. După o serie de instruiți prealabile primele testări prin intermediul Xpert MTB/Rif au început să fie efectuate în martie 2012 în cadrul LNR și extinse la celelalte unități de diagnosticare în trimestrul doi a anului 2012. În unele unități de diagnostic testarea s-a inițiat în trimestrul 3, 2012 (Regiunea Transnistreană și Centrul de testare HIV din Bălți).

Tabelul 4.1 Dinamica implementării testării prin Xpert MTB/Rif în Republica Moldova

Trimestrul	Nr. total de teste	Total Rezultate invalide		Teste invalid		Test cu eroare		Teste fără rezultat		Total Rezultate valide		MTB-		MTB+ total		MTB+ / RIF S		MTB+ / RIF R		MTB+ / RIF Indeterminat	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Q1-2012	184	20	10,9	0	0,0	12	6,5	8	4,3	164	89,1	103	56,0	61	33,2	38	20,7	23	12,5	0	0,0
Q2-2012	1342	82	6,1	4	0,3	63	4,7	15	1,1	1260	93,9	944	70,3	316	23,5	195	14,5	119	8,9	2	0,1
Q3-2012	2682	153	5,7	42	1,6	73	2,7	38	1,4	2529	94,3	1928	71,9	601	22,4	380	14,2	202	7,5	19	0,7
Q4-2012	4065	244	6,0	58	1,4	148	3,6	38	0,9	3821	94,0	3212	79,0	609	15,0	390	9,6	204	5,0	15	0,4
Q1-2013	5160	254	4,9	5	0,1	147	2,8	102	2,0	4906	95,1	42	0,8	706	13,7	440	8,5	248	4,8	18	0,3
Q2-2013	3366	172	5,1	8	0,2	107	3,2	57	1,7	3194	94,9	2663	79,1	531	15,8	359	10,7	163	4,8	9	0,3
Q3-2013	2426	123	5,1	10	0,4	58	2,4	55	2,3	2303	94,9	1856	76,5	447	18,4	268	11,0	163	6,7	16	0,7
Q4-2013	5509	252	4,6	18	0,3	172	3,1	62	1,1	5257	95,4	4537	82,4	720	13,1	418	7,6	247	4,5	55	1,0
Q1-2014	6388	222	3,5	23	0,4	124	1,9	75	1,2	6166	96,5	5402	84,6	764	12,0	479	7,5	258	4,0	27	0,4
Q2-2014	5648	174	3,1	9	0,2	119	2,1	46	0,8	5474	96,9	4756	84,2	718	12,7	477	8,4	221	3,9	20	0,4
Q3-2014	5126	164	3,2	13	0,3	104	2,0	47	0,9	4962	96,8	4138	80,7	824	16,1	542	10,6	265	5,2	17	0,3
Q4-2014	6158	249	4,0	8	0,1	160	2,6	81	1,3	5909	96,0	5213	84,7	696	11,3	424	6,9	247	4,0	25	0,4
Q1-2015	7913	321	4,1	32	0,4	188	2,4	101	1,3	7592	95,9	6813	86,1	779	9,8	457	5,8	295	3,7	27	0,3
Q2-2015	6598	240	3,6	29	0,4	179	2,7	32	0,5	6358	96,4	5658	85,8	700	10,6	401	6,1	259	3,9	40	0,6
Q3-2015	5485	196	3,6	27	0,5	145	2,6	24	0,4	5289	96,4	4694	85,6	595	10,8	360	6,6	186	3,4	49	0,9
Q4-2015	6424	371	5,8	26	0,4	285	4,4	60	0,9	6053	94,2	5396	84,0	657	10,2	393	6,1	227	3,5	37	0,6
TOTAL	74474	3237	4,3	312	0,4	2084	2,8	841	1,1	71237	95,7	57355	77,0	9724	13,1	6021	8,1	3327	4,5	376	0,5

La finele anului 2012 tehnologia Xpert a fost introdusă la nivel central, regional și raional, fiind disponibilă în 11 din cele 35 de teritorii de pe malul drept al țării (orașele Chișinău și Bălți și 9 raioane) asigurând o acoperire globală a populației de 55%. Testul Xpert a fost implementat și în cele două orașe mari din regiunea transnistreană (Tiraspol și Bender) și raionul Râbnîța, care reprezintă 63% din populația respectivă. După furnizarea a 5 instrumente suplimentare în luna martie 2013 distribuite în raioanele Drochia, Rezina, Călărași, Cimișlia și Taraclia, acoperirea totală a populației cu Xpert MTB/Rif a ajuns la aproximativ 64%. Consecutiv livrării a cinci instrumente suplimentare Xpert pentru raioanele Ocnița, Glodeni, Fălești, Cantemir și Slobozia (regiunea transnistreană) în 2014, s-a ajuns la acoperirea totală a populației în sectorul civil.

În perioada de studiu 2011-2015 au fost efectuate 74474 de teste Xpert MTB/RIF respectiv: anul 2012 - 8273 teste, anul 2013 - 16461, anul 2014 - 23320, anul 2015 - 262420 teste (**Tabelul 4.1**). Numărul testelor efectuate per unitate de timp a fost în continuă creștere atât datorită punerii în funcțiune a noi mașini Xpert cât și grație creșterii numărului de teste efectuate per fiecare unitate de diagnostic. Trebuie remarcat diminuarea în timp a numărului de teste invalide. La fel, numărul testelor efectuate per caz diagnosticat de MDR a crescut progresiv de la 15,1 teste/caz TB MDR (confirmate prin Xpert MTB/Rif) în 2012 până la 27,3 teste/caz TB MDR (confirmate prin Xpert MTB/Rif) în 2015 ($p=0,0001$).

4.1.3 Impactul Xpert MTB/Rif asupra întârzierii terapeutice în cazurile de TB MDR

În perioada examinată în SIME TB au fost înregistrate 5507 cazuri de tuberculoză MDR. În analiza efectuată nu au fost incluse cazurile cu date incomplete privitor la data stabilirii diagnosticului de tuberculoză sau data inițierii tratamentului pentru tuberculoza MDR. Astfel, în calculul final au fost considerate 4353 de cazuri, respectiv 730 din 1111 cazuri de TB MDR diagnosticate în anul 2011, 813 din 1121 - în anul 2012, 920 din 1162 - în anul 2013, 906 din 1047 - în anul 2014, 984 din 1066 - în anul 2015. Compararea timpului de întârziere terapeutică în perioada evaluată a evidențiat o reducere progresivă a acestuia o dată cu implementarea tehnicii Xpert MTB/Rif (**Figura 4.1 A, B**). Astfel, în 2011 mediana timpului de întârziere terapeutică a constituit 46,5 zile (intervalul dintre cuartile (IIQ) 14-89,25), 2012 - 36 zile (IIQ 11-75), 2013 - 24 zile (IIQ 7-63), 2014 - 10 (IIQ 3-42), 2015 - 8 zile (IIQ 2-28). La fel, corelarea dintre numărul de teste Xpert efectuate și timpul de întârziere terapeutică a demonstrat o asociere inversă puternică dintre acestea ($R = -0,88$ 95%ÎÎ -0,95 – -0,73 ; $R^2 = 0,79$, $p < 0,0001$; **Figura 4.1 C**).

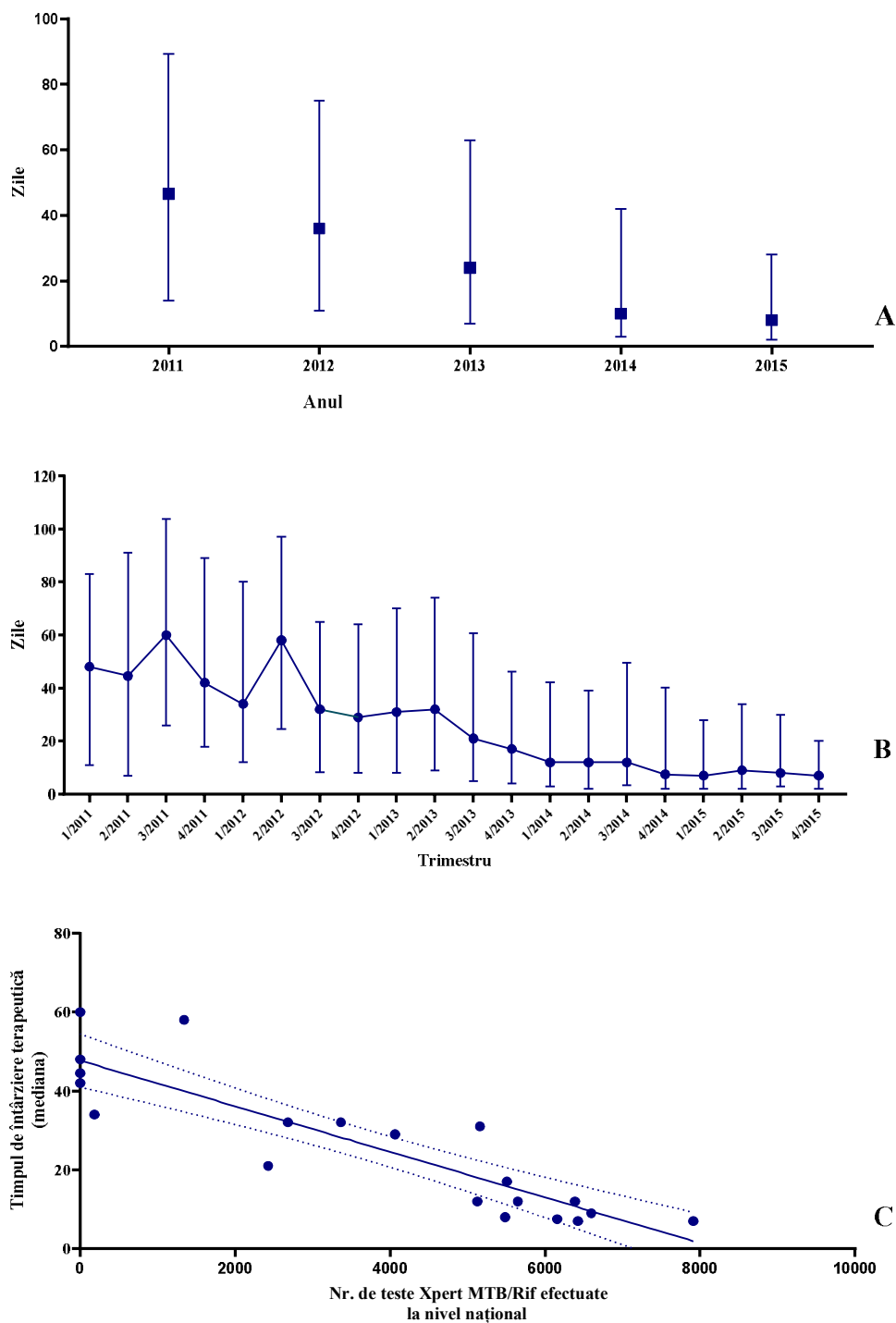


Figura 4.1. Dinamica timpului de întârziere terapeutică la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova în raport cu implementarea testării la nivel național prin Xpert MTB/RIF A) dinamica anuală, B) dinamica lunară, C) analiza corelațională dintre timpul de întârziere terapeutică și numărul de teste Xpert MTB/Rif efectuate la nivel național.

4.1.4 Sinteza și interpretarea rezultatelor aplicării Xpert MTB/Rif

Scopul de baza al analizei prezentate a fost compararea timpului de întârziere terapeutică la bolnavii cu tuberculoză MDR până și după implementarea la nivel național al testării prin Xpert MTB/RIF în Republica Moldova. Rezultatele obținute confirmă reducerea semnificativă a timpului de inițiere a tratamentului la bolnavii cu tuberculoză MDR, fiind înregistrată o reducere semnificativă de la 46 zile în 2011 la 8 zile în 2015.

Valoarea adăugată a datelor prezentate în raport cu cele disponibile în literatură este dată de caracterul național al cohorței analizate de bolnavi MDR dintr-o zonă geografică cu rată deosebit de înaltă a cazurilor de multidrog rezistență. Cel mai frecvent studiile din literatura cunoscută au analizat impactul implementării Xpert MTB/Rif pe cohorțe subnaționale din regiunile africană sau asiatică, care sunt caracterizate prin alte particularități ale epidemiei de tuberculoză (ex: prevalența înaltă a coinfecției HIV/TB, predominarea sectorului privat în oferirea îngrijirilor medicale etc.). Într-o metaanaliză recent publicată, care include studii realizate în țări din afara Regiunii Europene a OMS, autorii conchid despre reducerea timpului de întârziere terapeutică, secundar aplicării testării prin Xpert MTB/Rif, la bolnavii cu tuberculoză sensibilă cu 2,55 zile (95%ÎI 0,54 - 4,56), iar la cei cu tuberculoză MDR cu 45,32 zile (95%ÎI 30,27 - 60,37) [242]. Astfel, chiar dacă compararea directă a rezultatelor dintre diferite studii este limitată de diferențele în definițiile aplicate pentru termenul de "întârziere terapeutică", comparat cu rezultatele metaanalizei citate reducerea în întârzierea terapeutică asociată implementării Xpert MTB/Rif în Republica Moldova este de o magnitudine similară cu cea din alte zone geografice și sisteme de acordare a asistenței medicale.

Impactul direct al reducerii în întârzierea terapeutică asupra indicatorilor epidemiologici ai tuberculozei precum incidența și prevalența este mai dificil de apreciat, dar am putea admite că inițierea mai rapidă a unui tratament eficient întrerupe mai devreme transmiterea infecției către alte persoane cu care intră în contact acești bolnavi, astfel, contribuind la reducerea incidenței tuberculozei și potențial la prevenirea transmiterii nosocomiale a tulpinilor MDR. În același timp, nu trebuie desconsiderat nici beneficiul personal, pe care inițierea mai rapidă a tratamentului o oferă fiecărui bolnav testat, cel de evitare a expunerii neargumentate la cel puțin la două medicamente antituberculoase (izoniazida și rifampicina) cu potențiale efecte adverse, dar neeficiente în cazul tuberculozei MDR.

Afară de impactul asupra întârzierii terapeutice implementarea unui test diagnostic precum Xpert MTB/Rif ar putea contribui și la ameliorării rezultatelor tratamentului, în special la reducerea mortalității și la creșterea ratei de tratament de succes. Aceasta, la fel, urmare a inițierii

mai precoce a unui tratament corespunzător. Cu toate acestea câteva metaanalize publicate în ultima perioadă au conchis despre lipsa asocierii dintre aplicarea Xpert MTB/Rif și reducerea mortalității, aceeași lipsă de efect fiind raportă și în cazul ratei tratamentului de succes [243, 244]. Aceasta poate descuraja, însă, o interpretare la rece ne oferă explicația fenomenului. Succesul tratamentului antituberculos depinde nu doar de diagnosticul precoce, dar și de o serie de alți factori precum: disponibilitatea unui număr și cantități suficiente de medicamente antituberculoase, toleranța medicației, comorbidități, aderența pacientului la tratament și măsurile de menținere în terapie etc. Deosebit de importanți acești factori sunt la bolnavii cu tuberculoză MDR tratamentul căreia tradițional implică medicamente mai toxice și o durată mai îndelungată a terapiei. De menționat că în perioada analizată în Republica Moldova au fost implementate o serie de intervenții (afară de Xpert MTRB/Rif) cu potențial de ameliorarea a rezultatelor tratamentului MDR precum, introducerea în practica curentă a unor medicamente noi (linezolidul), oferirea suporturilor alimentare și compensărilor financiare pentru stimularea aderenței la tratament, desfășurarea campaniilor de informare și reduce a stigmatizării bolnavilor de tuberculoză [245]. Cuantificarea acestor cofactori în analiza efectuată în această lucrare nu a fost posibilă grație caracterului retrospectiv al acesteia, astfel fel că, aprecierea asocierii dintre implementarea Xpert MDRTB/Rif și rezultatele tratamentului în cohorta analizată (cohorta națională de bolnavi cu tuberculoză MDR, care au inițiat tratament în perioada de studiu) nu a fost posibil de efectuat.

Implementarea testului Xpert MTB/Rif la nivel național în Republica Moldova trebuie discutată și din perspectiva unui exemplu de introducere în practica curentă a unei tehnologii diagnostice care a implicat instruirea unui număr important de personal clinic și de laborator, în sens larg nefamiliarizat cu testările molecular-genetice. Astfel că, realizarea cu succes a acestui proiect ilustrează fezabilitatea aplicării tehnicii Xpert/MTB Rif la cele mai diverse nivele de acordare a asistenței medicale (medicină primară, serviciu pneumologic specializat, sistemul de oferire a îngrijirilor medicale persoanelor care trăiesc cu HIV), aspect cheie în conceptualizarea acestei tehnologii. În același timp, această experiență ar putea servi pe viitor în implementarea și a altor tehnologii de diagnostic molecular-genetic potențial mai atractive, cum ar fi tehnologiile bazate pe tehnica de secvențiere de nouă generație a genomului micobacterian [246].

4.2 Rolul examinării specimenelor bronhoscopice pentru confirmarea microbiologică a tuberculozei.

După cum a fost arătat în capitolul precedent pe parcursul perioadei 2012-2014 tehnologia Xpert MTB/Rif a devenit accesibilă pe întreg teritoriul Republicii Moldova [241]. Astfel, în perioada imediat următoare (2016-2018) conform datelor Programului național de răspuns la tuberculoză 95-97% dintre bolnavii diagnosticați cu tuberculoză au beneficiat de examinare prin testul Xpert MTB/Rif. Cu toate acestea, în aceeași perioadă la o treime dintre toți bolnavii de tuberculoză pulmonară în Moldova diagnosticul a fost stabilit în lipsa confirmării microbiologice. De remarcat că această cifră este comparabilă cu cea din Regiunea Europeană a OMS (cu unele variații) precum și cu cea la nivel mondial [1]. În condițiile accesibilității largi a testelor diagnostice în Republica Moldova cauzele neconfirmării microbiologice mai curând sunt date de limitele firești ale metodelor de diagnostic microbiologic (sensibilitatea redusă în unele grupuri de bolnavi precum cei cu microscopie negativă, imunocompromiși sau copii). O creștere a confirmării microbiologice a infecției micobacteriene în cazurile de tuberculoză pulmonară ar putea fi atinsă prin examinarea a specimenelor bronhoscopice (suplimentar la cele din spută) precum lavajul bronho-avleolar, spălăturile bronșice sau aspiratul bronșic [247]. În prezentul capitol sunt prezentate rezultatele aprecierii valorii adăugate a examinării microbiologice a probelor de aspirat bronșic pentru sporirea confirmării microbiologice a diagnosticului de tuberculoză pulmonară.

4.2.1 Material și metodă

Pentru evaluarea valorii adăugate a examinării microbiologice a probelor de aspirat bronșic în confirmarea microbiologică a diagnosticului de tuberculoză pulmonară a fost realizat un studiu diagnostic non-experimental transversal în care a fost apreciată acuratețea diagnostică a testelor rapide de confirmarea a infecției tuberculoase (Xpert MTB/Rif și microscopia la BAAR) în probele de aspirat bronșic obținute la pacienții cu rezultate negative ale examenelor microbiologice (microscopia la BAAR și Xpert MTB/Rif) în probele de spută liber expectorată.

Identificarea lotului de studiu

În scopul realizării studiului au fost identificați toți pacienții examinați în cadrul clinicii Institutului de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc" în perioada 2017-2018, la care examinările sputei prin microscopie BAAR și Xpert MTB/Rif au dat rezultate negative și la care complementar au fost examinate microbiologic speciunile de aspirat bronșic. Pentru identificarea cazurilor eligibile a fost utilizată componenta TB-06 a bazei de date SIME-TB, în care au fost selectate toate speciunile perechi de spută (cu rezultate microbiologice negative) și aspirat bronșic cu un

interval de timp de colectare dintre acestea nu mai mare de 7 zile. În studiu au fost incluse doar cazurile cu probe perechi care au fost examinate prin toate trei teste microbiologice standard (microscopia, Xpert MTB/Rif și cultură) în ambele tipuri de specimene (spută și aspirat bronșic).

Cadrul studiului

După cum a fost menționat și în capitolele precedente, clinica Institutului de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc" (IFP) este o instituție medicală de nivel terțiar specializată în acordarea serviciilor de diagnostic și tratament al tuberculozei, dar și al altor boli respiratorii (atât infecțioase cât și noninfecțioase). În contextul prezentei cercetări este necesar de a menționa că la majoritatea covârșitoare a bolnavilor examinați în această instituție (atât în serviciu de ambulatoriu cât și în serviciul spitalicesc) examinările diagnostice standard includ testele microbiologice de identificare a infecției prin *M. tuberculosis* inclusiv la cei cu o probabilitate redusă a infecției tuberculoase. La fel, în cazul efectuării examinărilor bronhoscopice colectarea specimenelor pentru examenele microbiologice pentru *M. tuberculosis* se efectuează la majoritatea bolnavilor examinați. Laboratorul național de referință în micobacteriologia tuberculozei (LNR), examinează toate specițiile colectate de la bolnavii investigați în cadrul IFP. Microscopia la BAAR, Xpert MTB/Rif și cultura la *M. tuberculosis* constituie bateria de teste standard de examinare a specimenelor recepționate în cadrul laboratorului. Rezultatele tuturor examinărilor efectuate în cadrul LNR sunt introduse în partea TB-06 a SIMETB.

Examinările microbiologice

Examinările microbiologice aferente cercetării, microscopia la BAAR, Xpert MTB/Rif, culturile pe medii lichide MGIT și cele pe medii solide Lowenstein-Jensen, au fost efectuate în conformitate cu procedurile operaționale standard ale LNR racordate la recomandările internaționale ale OMS [82, 235].

Analiza statistică

Aprecierea acurateții diagnostice a testelor microbiologice în specițiile de aspirat bronșic a fost determinată prin calcularea sensibilității, specificității, valorii predictive pozitive și a celei negative (PPV și NPV), ratei de probabilitate pentru un test negativ (LR-) și ratei de probabilitate pentru un test pozitiv (LR+), considerând drept test de referință cultura la *M. tuberculosis*. Pentru valorile găsite au fost calculate intervalele de încredere de 95% (95%Î) prin metoda Wilson-Brown.

4.2.2 Rezultatele examenului microbiologic al probelor de aspirat bronșic

În perioada de studiu au fost identificate 705 de pacienți cu probe perechi (spută și aspirat bronșic) examinate în cadrul LNR provenite din secțiile clinice ale IFP "Chiril Draganiuc". Caracteristicile demografice de bază a persoanelor de la care au fost obținute probele de spută incluse în analiză au fost date de rata bărbaților de 62% (440/705) și mediana vârstei de 57,0 [IIQ 45-65] ani.

Acuratețea diagnostică a testelor microbiologice în aspiratul bronșic în lotul general

La bolnavii analizați rezultatul pozitiv al culturii a fost înregistrat în 5,5% (39/705) cazuri, inclusiv în 23 cazuri cultura a fost pozitivă doar în aspiratul bronșic, 9 cazuri - în aspiratul bronșic și spută și în alte 3 cazuri doar din speciimenele de spută. Examenul prin microscopie la BAAR a fost pozitiv în aspiratul bronșic în 13 (1,8%) dintre cazurile analizate, iar examenul prin Xpert MTB/Rif (la fel în aspiratul bronșic) - 30 (4,2%) cazuri (**Figura 4.2**). Considerând cultura ca standard de referință au fost obținute următoarele valori ale sensibilității și specificității în aspiratul bronșic respectiv: 46,1% (95%ÎÎ 31,6% - 61,4%) și 98,2% (95%ÎÎ 96,9% - 99,0%) pentru Xpert MTB/Rif și 20,5% (95%ÎÎ 10,8% - 35,5%) și 99,2% (95%ÎÎ 98,5% - 99,7%) pentru microscopia la BAAR. La fel, rapoartele de probabilitate pentru un test pozitiv și respectiv negativ au constituit pentru Xpert MTB/Rif 14,8 (95%ÎÎ 8,6 - 25,5) și 0,56 (95%ÎÎ 0,42 - 0,74), iar pentru microscopia BAAR 27,3 (95%ÎÎ 9,4-79,6) și 0,8 (95%ÎÎ 0,68 - 0,94), respectiv.

Acuratețea diagnostică a testelor microbiologice în aspiratul bronșic la pacienții cu istoric de tuberculoză

În lotul de studiu 82 de bolnavi au avut un episod de tuberculoză în trecut (cazuri de recidivă sau după abandon). Considerând specificitatea redusă a testului Xpert MTB/Rif la acești bolnavi în sputa liber expectorată, acuratețea testelor microbiologice în aspiratul bronșic a fost apreciată și separat în acest subgrup de pacienți. Astfel, 7 dintre acești bolnavi au avut cultura pozitivă pentru *M. tuberculosis* -1 doar din spută, 1 din spută și din aspirat bronșic și 5 doar din aspirat bronșic. Rezultatul pozitiv al Xpert MTB/Rif a fost înregistrat la 3 bolnavi, iar microscopia pozitivă la 2 bolnavi. Acestea corespund în cazul Xpert MTB/Rif unei sensibilități de 30,0% (95%ÎÎ 10,8 - 60,32) și specificități de 48,7% (95%ÎÎ 40,9% - 56,5%), iar pentru microscopia la BAAR, respectiv, 22,2% (95%ÎÎ 3,9 - 54,7) și 48,4% (95%ÎÎ 40,6 - 56,2) (**Figura 4.3**). La fel, raportul probabilității pentru un test pozitiv și respectiv negativ pentru Xpert MTB/Rif a constituit 0,58 (95%ÎÎ 0,22-1,53) și 1,44 (0,93 - 2,22) iar, pentru microscopia BAAR 0,43 (95%ÎÎ 0,13 - 1,48) și 1,61 (1,61 - 2,36) (**Figura 4.5**).

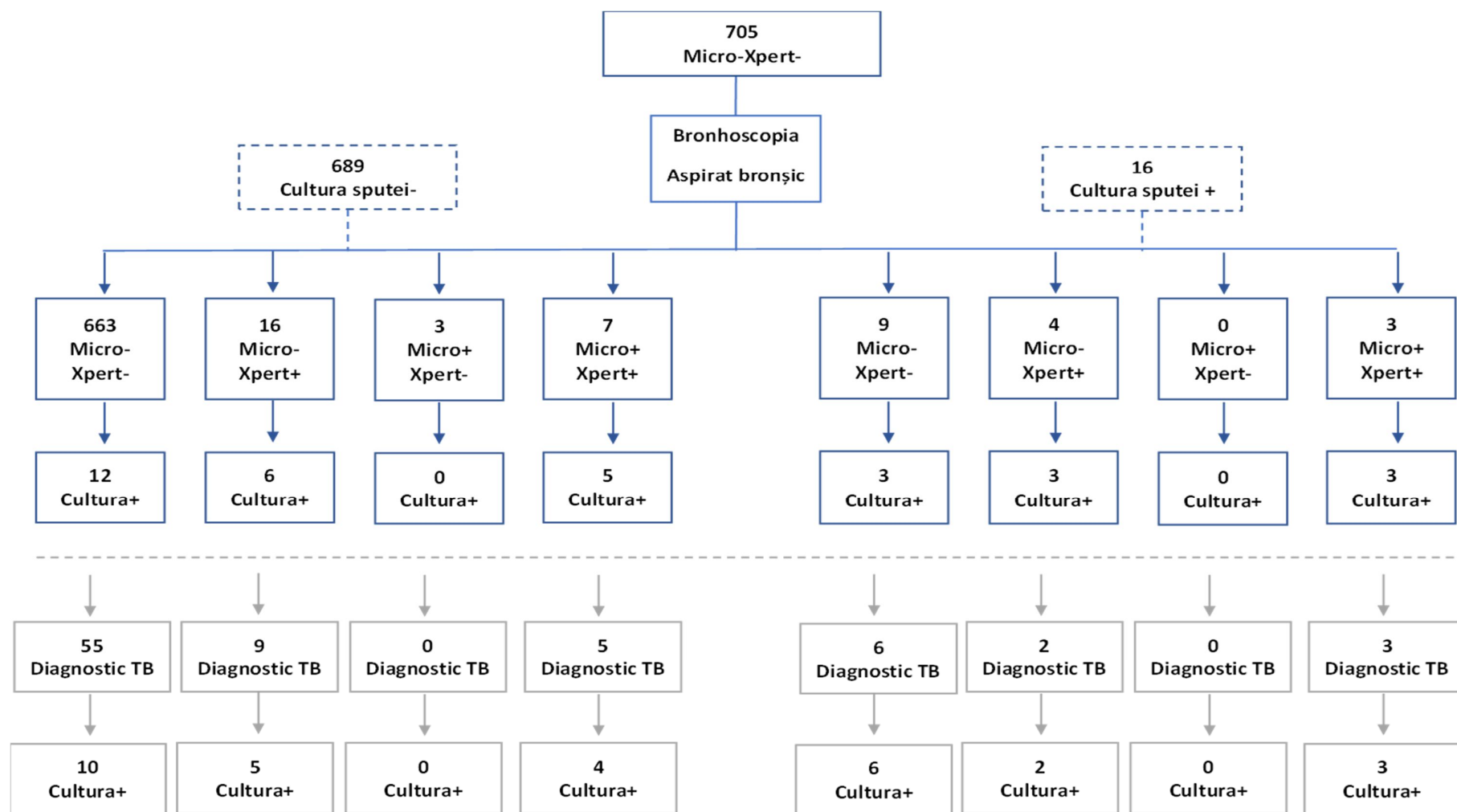


Figura 4.2. Rezultatele testelor microbiologice în aspiratul bronșic la bolnavii cu microscopie și Xpert MTB/Rif negative în sputa liber expectorată

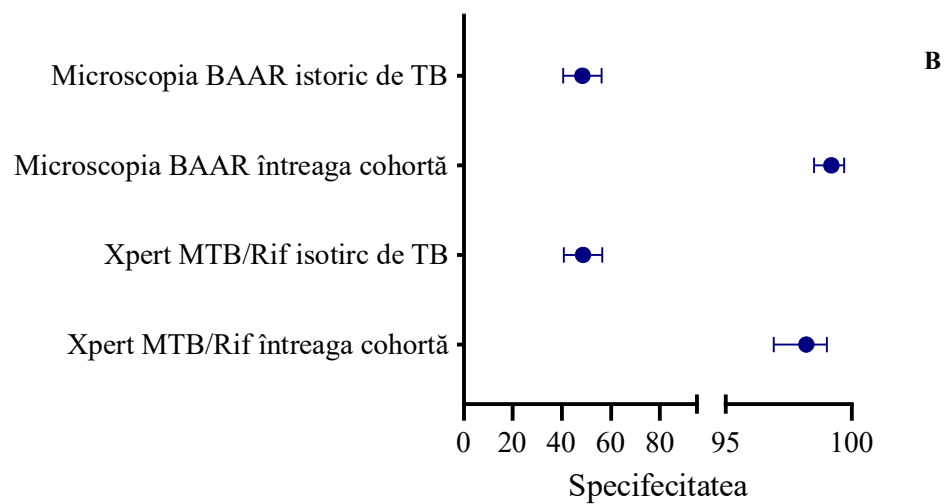
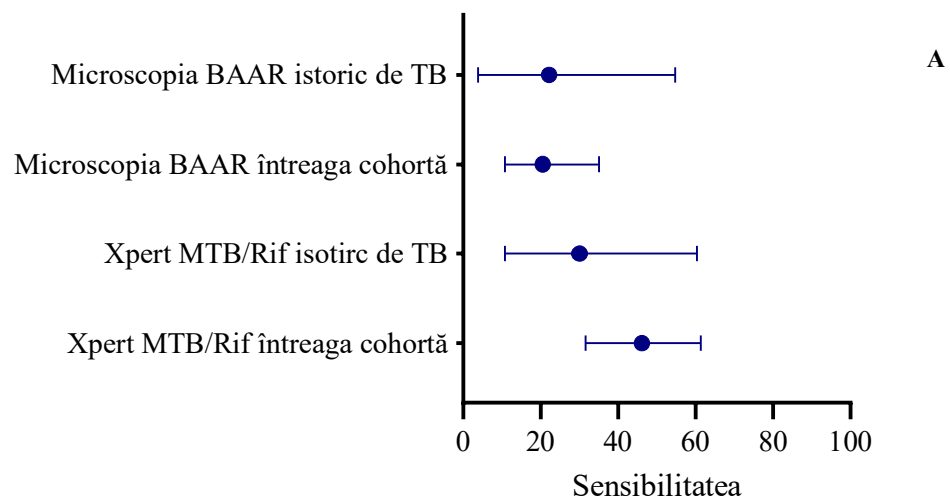


Figura 4.3. Sensibilitatea (A) și specificitatea (B) microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorată în întreaga cohortă și subgrupul de bolnavi cu istoric de tuberculoză

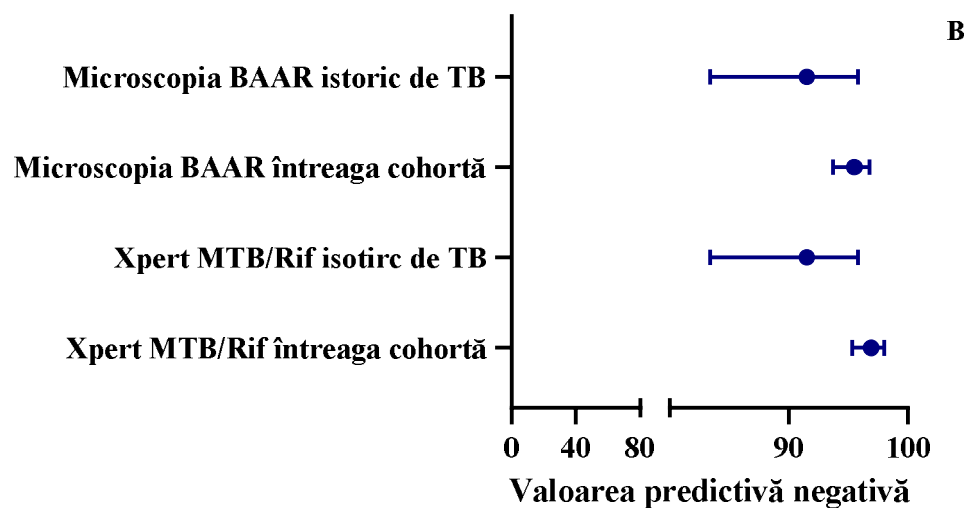
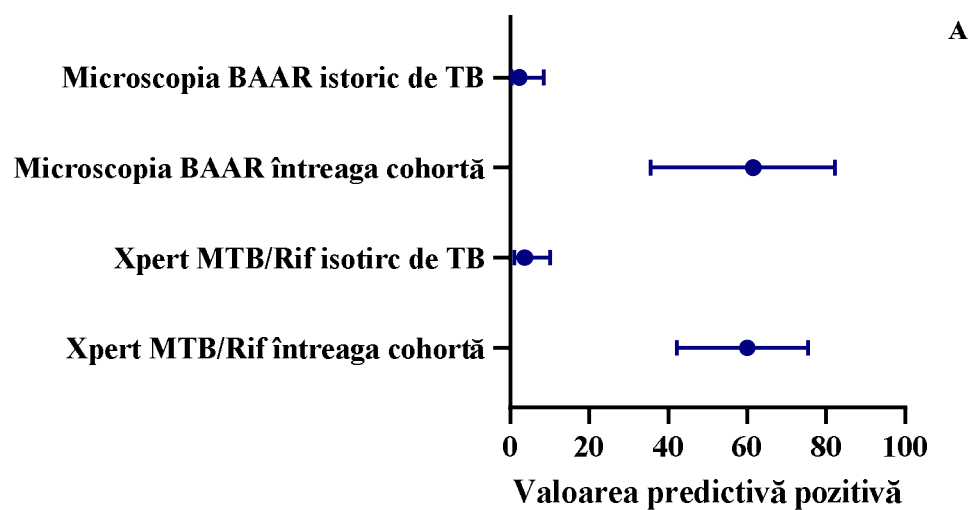


Figura 4.4. Valoarea predictivă pozitivă (A) și valoarea predictivă negativă (B) ale microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorată în întreaga cohortă și subgrupul de bolnavi cu istoric de tuberculoză

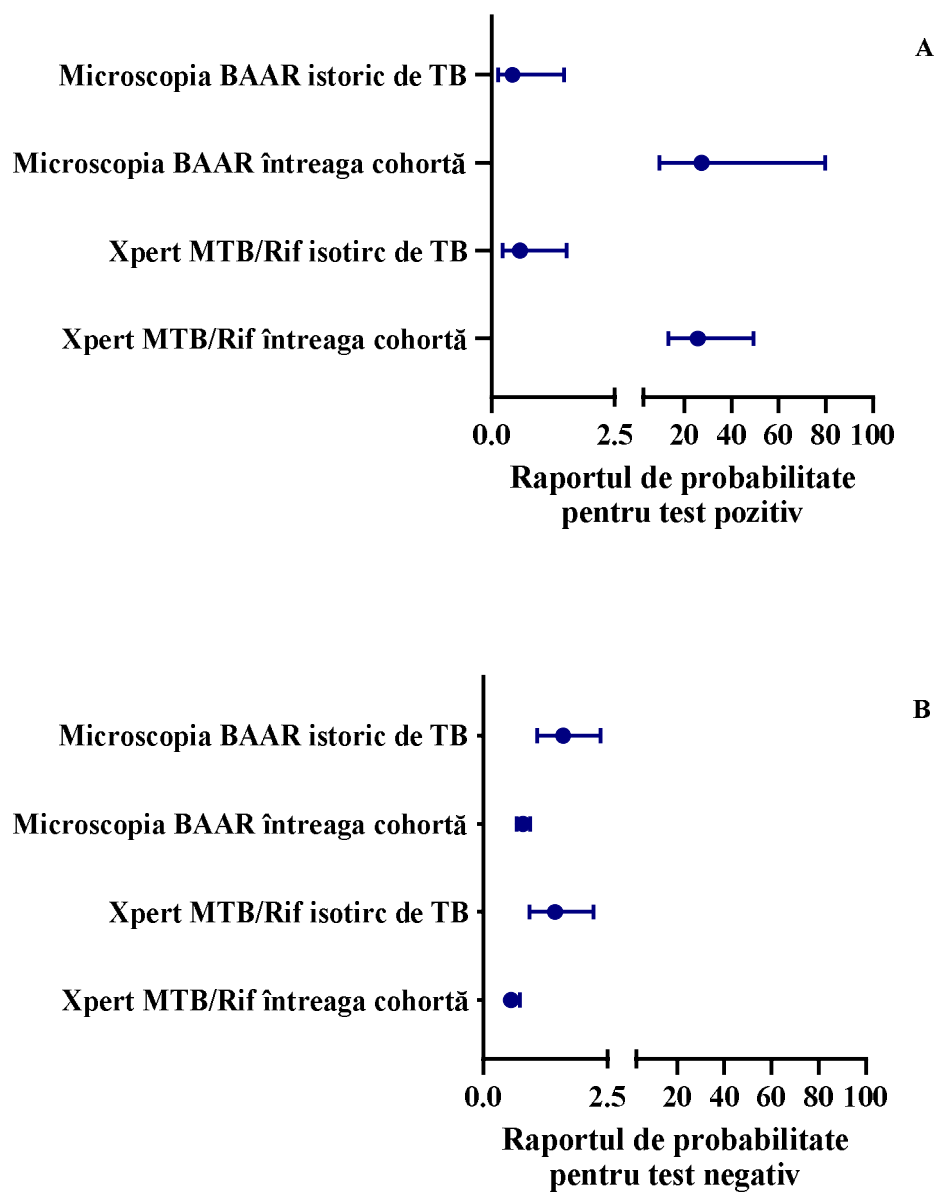


Figura 4.5. Raportul de probabilitate pentru un test pozitiv (A) și raportul de probabilitate pentru un test negativ (B) ale microscopiei și Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu rezultate negative ale ambelor teste în sputa liber expectorată în întreaga cohortă și subgrupul de bolnavi cu istoric de tuberculoză suportată

Valoarea adăugată a examinării aspiratului bronșic în diagnosticul tuberculozei pulmonare

Diagnosticul de tuberculoză a fost stabilit la 91 dintre pacienții incluși în studiu, ulterior la 11 dintre aceștia tuberculoza a fost infirmată (după inițierea tratamentului). Astfel, la bolnavii cu diagnostic definitiv de tuberculoză (n=80), cultura a fost pozitivă în 30 dintre cazuri: 3 (3,7%) cazuri doar în spută, 8 (10%) - în spută și aspirat bronșic, 19 (23,7%) - doar în aspiratul bronșic (**Figura 4.6**). La fel, Xpert MTB/Rif a fost pozitiv în 19/80 cazuri (23,7%), iar microscopia în 8 cazuri (toate Xpert MTB/Rif pozitive).

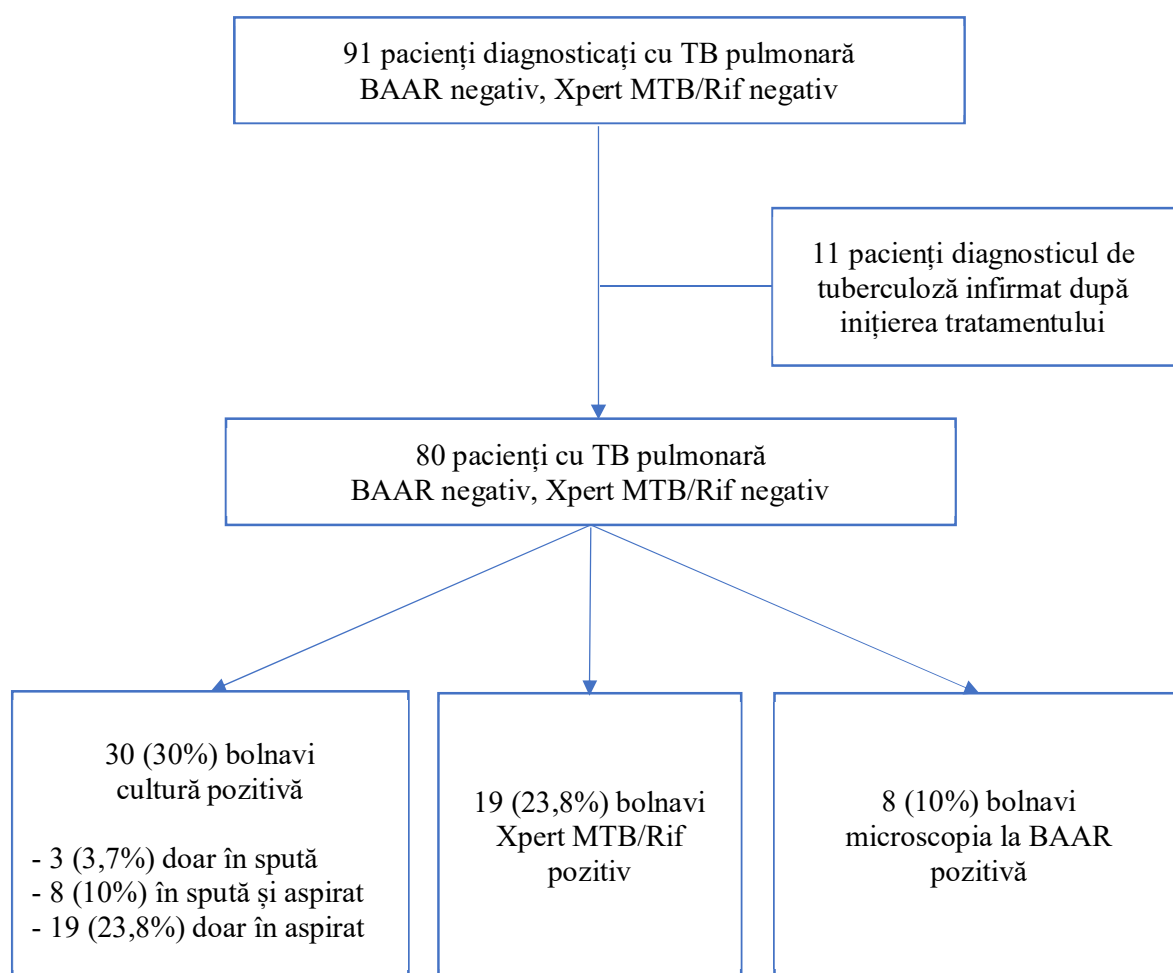


Figura 4.6. Rata confirmării microbiologice a tuberculozei pulmonare prin evaluarea aspiratului bronșic la bolnavii cu microscopie și Xpert MTB/Rif negative în spută

4.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor examinării prin teste molecular genetice a specimenelor de aspirat bronșic

În prezenta lucrare a fost apreciată acuratețea diagnostică a testelor microbiologice de confirmare a infecției cu *M. tuberculosis* la aplicarea acestora în speciemenle de aspirat bronșic la persoanele cu teste negative (Xpert MTB/Rif și microscopia BAAR) în sputa liber expectorată. Testul de interes central în acest context a fost Xpert MTB/Rif în calitate de test rapid, larg accesibil, cu valori ale sensibilității și specificității care se apropie de cele ale culturii în probele de spută, concomitent fiind apreciată și acuratețea microscopiei BAAR în calitate de test rapid clasic unicul disponibil anterior implementării metodelor molecular genetice de diagnostic. Rezultatele obținute pentru Xpert MTB/Rif, la aplicare în aspiratul bronșic, demonstrează o sensibilitate moderată combinată cu o specificitate excelentă. La fel, datele obținute au demonstrat că examinările pe probe de aspirat bronșic au permis confirmarea microbiologică a diagnosticului de tuberculoză în o pătrime dintre cazurile la care aceasta nu a fost posibil prin examenul doar a probelor de spută liber expectorată.

Utilizarea specimenelor bronhoscopice este unanim recunoscută în calitate de una dintre soluțiile aplicate pentru confirmarea microbiologică a infecției tuberculoase în formele paucibacilare de boală [248]. De regulă, în literatura dedicată acestui subiect în calitate de specimen bronhosopic sunt examinate fie lavajul bronhoalveolar fie spălăturile bronșice [249]. În prezenta lucrare a fost apreciat rolul testărilor microbiologice în aspiratului bronșic, specimen recoltat mai ușor în timpul examinării bronhoscopice (comparativ cu lavajul sau spălăturile bronșice). Rezultatele obținute demonstrează pentru Xpert MTB/Rif o acuratețe diagnostică superioară microscopiei, care permite confirmarea rapidă a *M. tuberculosis* la persoanele cu spută paucibacilară. În multe dintre lucrările care au examinat performanțele testului Xpert MTB/Rif în speciemenle de lavaj bronhoalveolar sau spălături bronșice valorile raportate ale sensibilității sunt superioare celor găsite în prezenta lucrare [248, 250], fapt într-un fel firesc considerând că în calitate de criteriu de calificare a sputei ca microbiologic negativă era aplicat rezultatul negativ al microscopiei și nu și a Xpert MTB/Rif ca în prezentul studiu. Astfel, rezultate prezentate caracterizează performanțele Xpert într-o cohortă de pacienți cu un grad de paucibacilaritate semnificativ mai exprimată decât în alte cohorte raportate în literatură.

Rezultatele descrise demonstrează performanțe diagnostice mai modeste a Xpert MTB/Rif în aspiratul bronșic la bolnavii cu anamnezic de tuberculoză. O scădere deosebit de dramatică este în cazul specificității (redușă de circa 2 ori). Acest fenomen este unul predictibil, rata rezultatelor fals pozitive fiind una sporită și în cazul examinării probelor de spută [251]. Cauza

unei specificități reduse de regulă este determinată de potențiala expectorarea de către pacienți cu anamneză de boală tuberculoasă a unor micobacterii (fragmente de micobacterii) neviabile, într-un fel restante în leziunile sechelare posttuberculoase [252].

Creșterea sensibilității testării prin tehnica Xpert la pacienții paucibacilari (în special cei imunocompromiși) a fost raportată prin utilizarea cartușelor Xpert Ultra [253]. Aplicarea lor în speciemenele de tip aspirat bronșic ar putea contribui la creșterea sensibilității testului și în acest tip de probe biologice. În prezentul studiu evaluarea și compararea celor două variante ale testului Xpert nu a fost posibilă, dar trebuie recunoscută plauzibilitatea acestei abordări.

După cum a fost menționat și mai sus în circa o treime dintre toate cazurile de tuberculoză pulmonară diagnosticate în Republica Moldova și în majoritatea țărilor din regiunea Europeană a OMS (zonă cu un acces înalt la metodele de diagnostic microbiologic) confirmarea infecției cu *M. tuberculosis* eșuează [21]. Conform rezultatelor obținute în această lucrare până la o pătrime dintre bolnavii cu specimene paucibacilare de spută pot fi confirmați microbiologic în caz de examinare a speciemenelor de aspirat bronșic. În mod firesc efectuarea bronhoscopiei impune accesibilitatea la un serviciu serviciului bronhoscopic, în care activează medici experimentați în colectarea speciemenelor de interes cu asigurarea măsurilor de control infecțios. La ora actuală astfel de unități sunt disponibile într-un număr minim de instituții medicale în Republica Moldova. Cu toate acestea, includerea examinării speciemenelor bronhoscopice prin testele microbiologice de identificare a *M. tuberculosis* în algoritmele de diagnostic este esențială pentru managementul adecvat al cazurilor paucibacilare de tuberculoză. Aceasta deoarece confirmarea microbiologică a infecției permite și stabilirea pattern-ului de rezistență cu evitarea administrării tratamentului antituberculos inefficient la pacienții cu tuberculoză rezistentă la medicamente, în special la cei MDR. În acest context reamintit faptul că bolnavii de tuberculoză MDR constituie peste o treime dintre toate cazurile de tuberculoză în Republica Moldova.

La două treimi dintre pacienții diagnosticați cu tuberculoză în cohorta analizată (în pofida examinării aspiratului bronșic), diagnosticul de tuberculoză a fost stabilit în baza criteriilor clinico-imagistice, iar la 11 dintre aceștia ulterior a fost infirmat. Acest fapt atenționează încă o dată asupra posibilității unor diagnostice alternative chiar și în cazurile cu semne clinico-radiologice sugestive pentru tuberculoză. Posibilitatea unor astfel de confuzii diagnostice în mare parte este condiționată de accesul limitat la testele de confirmarea a altor boli de pe lista de diagnostic diferențial al tuberculozei pulmonare. Din păcate accesul la multe dintre aceste metode diagnostice este cost dependentă și în consecință mult redusă în țările cu venituri mici dar cu incidență înaltă a tuberculozei.

Rezultatele prezentei analize trebuie interpretate din perspectiva unor limite metodologice precum: imposibilitate de a stratifica rezultatele examinărilor microbiologice conform statutului HIV al bolnavilor examinați, extinderii radiologice a leziunilor pulmonare, sau a segmentului arborelui bronșic de unde a fost efectuată colectarea aspiratului bronșic. La fel, trebuie considerat faptul că rezultatele sunt obținute în cadrul unei instituții medicale de nivel terțiar cu unitate bronhosopică în care activează medici înalt experimentați în efectuarea examinărilor bronhosopice de rând cu efectuarea examinărilor microbiologice într-un laborator cu un nivel înalt al calității.

4.3 Concluzii la capitolul 4

1. Implementarea Xpert MTB/Rif la nivel național s-a asociat cu reducerea semnificativă a întârzierii terapeutice la bolnavii adulți cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă.

2. Performanțele diagnostice ale microscopiei la BAAR în speciemenle de aspirat bronșic la bolnavii cu probe de spută paucibacilară se caracterizează prin sensibilitate redusă și specificitate ridicată.

3. Performanțele diagnostice ale Xpert MTB/Rif în speciemenle de aspirat bronșic la bolnavii cu probe de spută paucibacilară se caracterizează prin sensibilitate moderată, dar superioară celei a microscopiei, și specificitatea înaltă.

4. Aplicarea testărilor microbiologice în speciemenle de aspirat bronșic contribuie la confirmarea microbiologică suplimentară la o pătrime dintre bolnavii de tuberculoză pulmonară cu probe de spută paucibacilară.

5. INTERVENȚII DE EFICIENTIZARE A TRATAMENTULUI TUBERCULOZEI

5.1 Impactul asupra rezultatelor tratamentului a includerii badaquilinei în schemele terapeutice la bolnavii cu tuberculoză MDR

Rezultatele tratamentului în tuberculoza MDR continuă a fi sub nivelul celor dorite, rata tratamentului de succes oscilând în jurul valorii de 60% atât la nivel internațional cât și în Republica Moldova [21]. Pe parcursul ultimelor decenii identificarea de noi medicamente și scheme terapeutice eficiente în tuberculoza MDR a continuat să fie o prioritate de cercetare în acest domeniu. Rezultatul acestor eforturi a fost identificarea unui nou compus din grupul diarilchinolonelor - badaquilina. După licențierea internațională (2012-2103) în septembrie 2016 badaquilina a început a fi utilizată în schemele de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR și în Republica Moldova. Datele derivate din trialurile clinice de faza II B disponibile la acel moment sugerau eficacitatea înaltă a acestui medicament în cazurile de boală provocate de tulpini MDR ale *M. tuberculosis* [166, 254]. Cu toate acestea eficiența utilizării medicamentului în practica cotidiană (“în viața reală”) în condițiile programelor naționale de control al tuberculozei (condiții programatice) rămânea neevaluată. În prezentul capitol este apreciat impactul asupra rezultatelor tratamentului a includerii badaquilinei în schemele terapeutice la bolnavii de tuberculoză MDR aplicate în condiții programatice în Republica Moldova.

5.1.1 *Material și metodă*

A fost efectuat un studiu retrospectiv de tip caz-control, cu identificarea cazurilor perechi în baza scorului de propensiune, în care au fost comparate rezultatele tratamentului la primii bolnavi cu tuberculoză pulmonară MDR care au primit tratament cu badaquilină în Republica Moldova în perioada anilor 2016-2018 (cohorta badaquilină) cu cele ale bolnavilor de tuberculoză pulmonară MDR fără de tratament cu badaquilină (cohorta non-badaquilină), care au inițiat tratamentul în aceeași perioadă în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză. Constituirea cohortelor de studiu a fost realizată în baza scorului de propensiune. În ambele cohorte au fost evaluate rata de conversie a sputei la termenul de 6 luni de la inițierea tratamentului MDR, timpul de conversie a sputei și rezultatul final al tratamentului conform definițiilor OMS și TBNET.

Cardul studiului

În perioada de studiu în Republica Moldova pentru faza inițială a tratamentului bolnavii cu tuberculoză MDR erau spitalizați într-o singură instituție medicală specializată Institutul de

ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", care include două clinici, la Chișinău și Vorniceni. În cadrul acestora spitalizarea inițială putea dura un timp variabil (în mediu 2-3 luni), de regulă până la definitivarea schemei de tratament și obținerea conversiei microscopiei sputei. După externare tratamentul bolnavilor cu tuberculoză MDR era administrat sub directă supraveghere (DOT) la locul de trai al pacientului sub coordonarea medicului pneumoftiziolog din unitatea teritorial-administrativă respectivă.

Medicamentele antituberculoase precum și examinările de laborator și imagistice aferente diagnosticului tuberculozei și monitorizării tratamentului acesteia sunt oferite gratuit în Republica Moldova. Deciziile privitor la schema inițială de tratament la bolnavii cu tuberculoză MDR și posibilele ajustări ulterioare sunt efectuate de către Comitetul național de management al cazului de tuberculoză MDR. Acesta se întrunește cel puțin o dată pe săptămână. Toți pacienții diagnosticați cu tuberculoză în Republica Moldova sunt înregistrați în baza de date electronică SIME-TB, care conține informații privitor la caracteristicile demografice, epidemiologice, microbiologice și informațiile despre tratamentul bolnavilor de tuberculoză din țară.

Selectarea schemelor de tratament în tuberculoza MDR

Tratamentul bolnavilor cu tuberculoză MDR în Republica Moldova se efectuează în conformitate cu prevederile Protocolului clinic național "Tuberculoza la adult", care este ajustat la recomandările OMS în acest sens [255]. La momentul efectuării studiului acesta prevedea ca toți pacienții cu tuberculoză MDR să inițieze un tratament standard cu medicamente de lina a doua, care includea o fluorochinolonă, o aminoglicozidă injectabilă (capreomicina sau amikacina), etionamida, cicloserina și pirazinamida. Ulterior acesta putea suferi anumite ajustări o dată cu obținerea rezultatelor testelor de sensibilitate la medicamente (TSM). Durata tratamentului în cazul aplicării acestei scheme standardizate de tratament era ancorată la conversia sputoculturii și includea o fază inițială (intensivă) cu o durată de 6-8 luni, urmată de o fază de continuare de 12-16 luni. Monitorizarea eficacității tratamentului în mod obișnuit include efectuarea lunară a sputoculturii până la atingere conversiei sputei după care trimestrial. La fel, cel puțin trimestrial este efectuată evaluarea imagistică prin radiografie toracică și după caz aprecierea unor parametri biochimici ai sângelui.

Odată ce badaquilina a devenit accesibilă și în Republica Moldova aceasta inițial a fost inclusă în tratamentul celor mai gravi bolnavi cu rezistență extinsă la medicamentele antituberculoase. Prescrierea înalt selectivă era condiționată atât de recomandările OMS de la acea etapă cât și accesibilitatea limitată a badaquilinei. Odată cu creșterea accesibilității badaquilinei indicațiile pentru utilizarea acesteia au devenit ușor mai permissive iar, schemele de tratament cu

badaquilină au fost prescrise majorității bolnavilor cu MDR cu rezistență documentată la fluorochinolone, precum și celor care au suferit eșec terapeutic pe o schemă de tratament fără de badaquilină. Odată cu revizuirea în 2019 de către OMS a recomandărilor (inclusiv a priorității medicamentelor) pentru tratamentul tuberculozei MDR, schemele de tratament cu badaquilină au început a fi indicate inclusiv pacienților cu tuberculoză MDR de tip caz nou, fără de rezistență adițională la alte medicamente antituberculoase de linia doi. Pacienții care au inițiat tratamentul cu badaquilină pe lângă monitorizarea de bază, descrisă mai sus, au fost evaluați prin ECG (în săptămânile 2, 4, 8 și 24 de administrare a badaquilinei, precum și suplentar la solicitarea medicului în supravegherea căruia se afla bolnavul).

Selectarea loturilor de studiu

Cohortele de studiu (badaquilină și non-badaquilină) au fost selectate din baza de date SIME-TB din care au fost extrase toate cazurile de boală MDR înregistrate în perioada 2016-2018. Intervalul de timp selectat a fost în mare parte condiționat de probabilitatea maximă de finalizare a tratamentului MDR de către bolnavii incluși în studiu la momentul extragerii datelor primare din SIME-TB (a. 2020). Astfel, dintre cazurile identificate în studiu au fost incluși toți bolnavii adulți (mai mari de 18 ani) cu tuberculoză pulmonară confirmată prin cultură, care au finalizat tratamentul al momentul extragerii datelor primare (inclusiv cazurile de pierdere din supraveghere și cele de deces). Cazurile de boală neconfirmate prin cultură, cele pediatrice sau extrapulmonare au fost excluse din analiza efectuată. În baza criteriului de administrare a badaquilinei în episodul respectiv de boală toți bolnavii identificați au fost atribuiți la una din cele două cohorte de studiu (badaquilină sau non-badaquilină). Cohortele rezultate au fost potrivite în baza scorului de propensiune utilizând următoarele variabilele: vârsta, sexul, zona de reședință, prezența leziunilor cavitare, statutul HIV, microscopia pozitivă la inițierea tratamentului, rezistența la fluorochinolone, istoric de tuberculoză și medicamentele utilizate în tratament în episodul curent (fluorochinolone, capreomicină, amikacină, linezolid, etionamidă, cicloserină, imipenem, acid para-aminosalicilic, pirazinamidă, etambutol, isoniazidă (în doze crescute), clofazemină și delamanid).

Analiza statistica

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul programului R versiunea 3.6.3. Variabilele continue au fost prezentate ca mediane cu intervalul dintre cuartile, iar cele categoriale ca valori procentuale. Scorul de propensiune în bază logit a fost calculat cu ajutorul pachetului R MatchIT utilizând variabilele enumerate mai sus. În baza scorului pentru fiecare dintre bolnavii

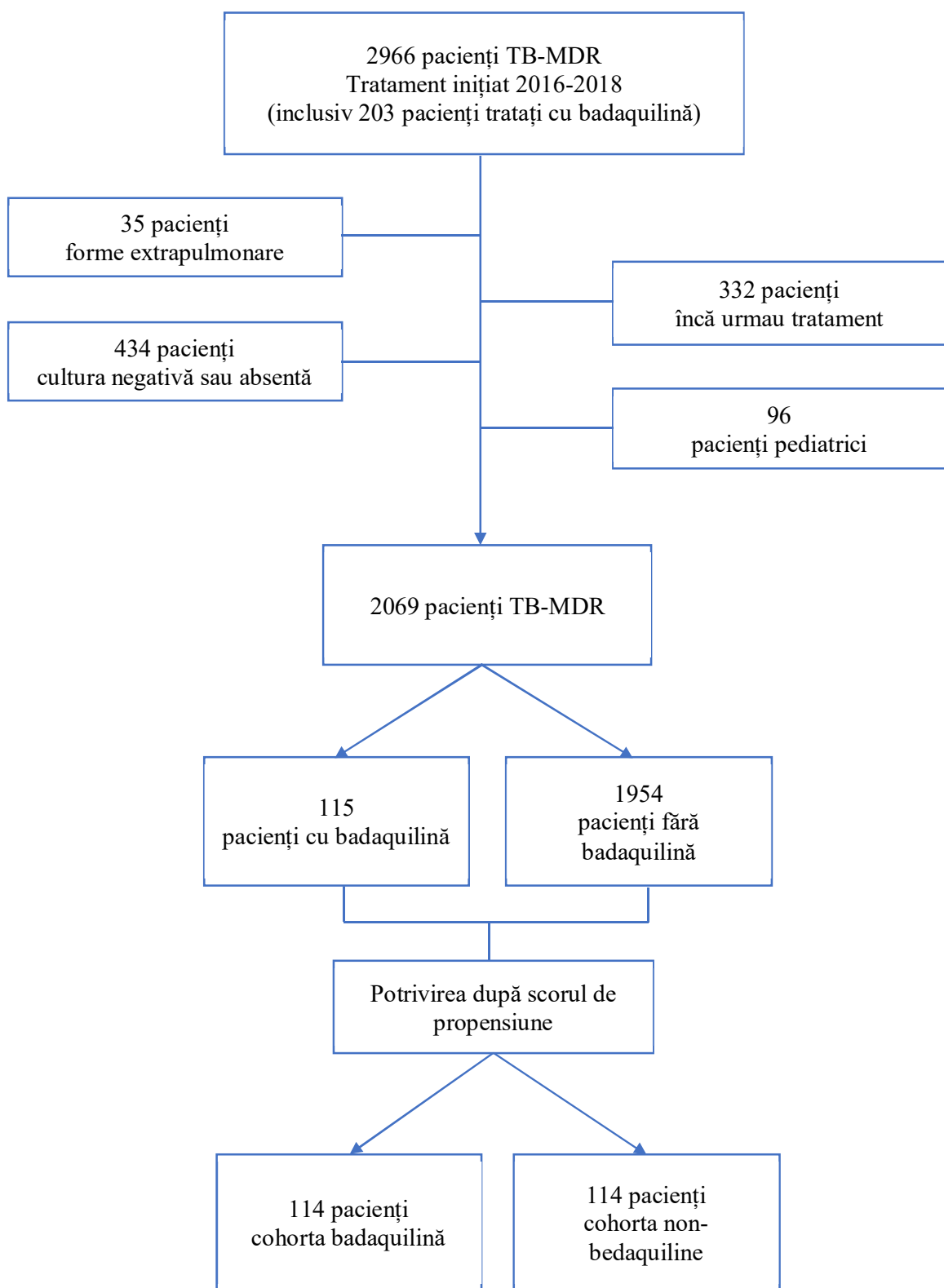


Figura 5.1. Selectarea cohortelor de studiu

din cohorta badaquilină a fost identificat un bolnav cu scorul maxim apropiat din cohorta non badaquilină. Potrivirea în baza scorului de propensiune a fost testată cu ajutorul pachetului R *table one* și standardizat prin valoarea medie a diferențelor. Pentru variabilele continue tipul de distribuție a fost verificat prin testul Shapiro-Wilk.

Pentru prezentarea grafică a rezultatelor a fost aplicat programul Graphpad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

5.1.2 Rezultatele tratamentului la bolnavii cu scheme de tratament cu și fără de badaquilină

În perioada de studiu (2016-2018) în baza de date SIME-TB au fost înregistrate 2966 de pacienți care au inițiat tratamentul pentru tuberculoza MDR (inclusiv 203 pacienți care au administrat și badaquilină). Din studiu au fost excluși: 332 de bolnavi care încă nu încheiaseră tratamentul la momentul extragerii datelor primare, 35 de bolnavi cu tuberculoză extrapulmonară și 434 de pacienți cu rezultatele culturii negative sau absente la momentul stabilirii diagnosticului (**Figura 5.1**). Astfel, în analiza efectuată au fost incluse 2069 de bolnavi cu tuberculoză MDR. Dintre aceștia 115 au fost repartizați în cohorta badaquilină și 1954 în cohorta non-badaquilină. După potrivirea în baza scorului de propensiune în fiecare dintre cohorte au fost incluși câte 114 bolnavi. Între aceste cohorte nu erau diferențe statistice semnificative în ceea ce privește vârsta, sexul, mediul de trai, microscopia BAAR pozitivă la inițierea tratamentului, prezența leziunilor cavitare, rezistența la fluorochinolone și anamneza de tuberculoză (**Tabelul 5.1**)

Tratamentul administrat

Medicamentele incluse în schemele de tratament ale bolnavilor din studiu sunt prezentate în **tabelul 5.2**. După potrivirea în baza scorului de propensiune cohortele studiate erau comparabile după medicamentele utilizate excepție fiind badaquilina.

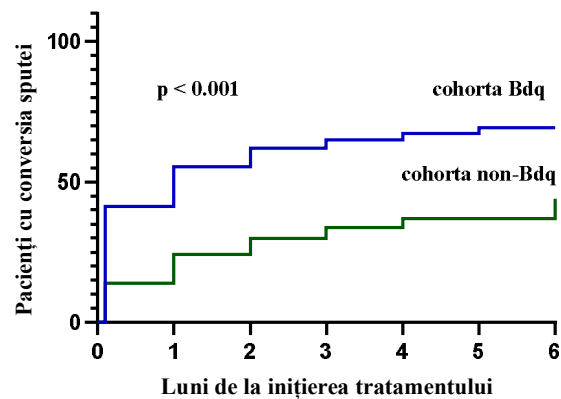
La toți pacienții administrarea badaquilinei a fost inițiată în spital. La 21 dintre bolnavi badaquilina a fost inclusă în schema inițială de tratament, iar la ceilalți 93 a fost aplicată pentru ajustarea schemei inițiale, secundar identificării rezistenței față de unele medicamentele. Dintre bolnavii tratați cu badaquilină 50,9% au inițiat tratamentul după cel puțin un episod precedent de boală finalizat cu eșec al tratamentului. La 50 dintre cei 93 de bolnavi la care badaquilina a fost inclusă în schema de tratament pentru ajustarea terapiei, medicamentul a fost adăugat sau substituit de unul singur. Mediana duratei de timp de administrare a badaquilinei a fost 34 [24-40] de săptămâni. Extinderea duratei de administrare a badaquilinei a fost decisă de către comitetul de

Tabelul 5.1. Caracteristica cohortelor studiate, badaquilină și non-badaquilină

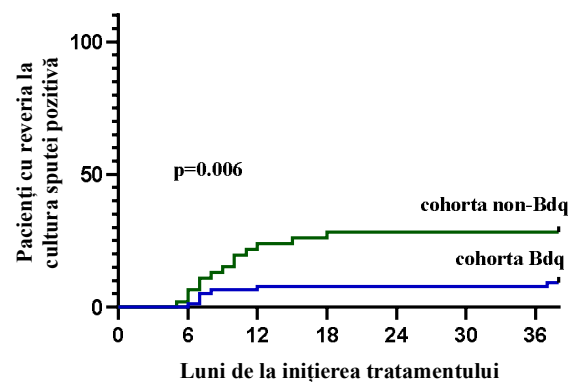
	Până la potrivirea după scorul de propensiune				După potrivirea după scorul de propensiune			
	Badaquilina (n=115)	Non-Badaquilina (n=1954)	P	DMS	Badaquilina (n=114)	Non-Badaquilina (n=114)	p	DMS
Vârsta (mediana; IC)	37 (31-44)	39 (32-50)	0,02	0,27	37 (31 – 44)	39 (32 – 46)	0,4	0,12
Sex (bărbați)	88 (76,5%)	1549 (79,3%)	0,5	0,07	87 (76,3%)	85 (74,6%)	0,8	0,04
Domiciliu mediu rural	57 (50%)	1066 [#] (55,6%)	0,3	0,10	57 (50,0%)	52 (45,6%)	0,5	0,09
Leziuni cavitare	94 (81,7%)	1165 [#] (60,2%)	<0,0001	0,49	93 (81,6%)	98 (86,0%)	0,4	0,12
Statut HIV pozitiv	17 (14,8%)	276 (14,1%)	0,8	0,02	17 (14,9%)	19 (16,7%)	0,7	0,05
Microscopie pozitivă	85 (73,9%)	1122 (57,4%)	0,0005	0,35	84(73,7%)	93 (81,6%)	0,1	0,19
Rezistența la FQ	76 (72,4%)	485 (29,6%)	<0,0001	0,94	76 (73,1%)	73 (69,5%)	0,6	0,08
Istoric de tuberculoză				0,78				0,10
eșecul tratamentului	59 (51,3%)	364 (18,6%)	<0,0001		58 (50,9%)	58 (50,9%)	0,7	
pierderea din supraveghere	18 (15,7%)	271 (13,9%)	0,6		18 (15,8%)	29 (25,4%)	0,2	
recidivă	15 (13,0%)	446 (22,8%)	0,01		15 (13,2%)	7 (6,1%)	0,7	
caz nou	23 (20,0%)	873 (44,7%)	<0,0001		23 (20,2%)	20 (17,6%)	0,7	

FQ - fluorochinolone; IC - intervalul dintre cuartile; TB - tuberculoza; DMS - diferența medie standardizată; [#] - 1936 cazuri analizate.

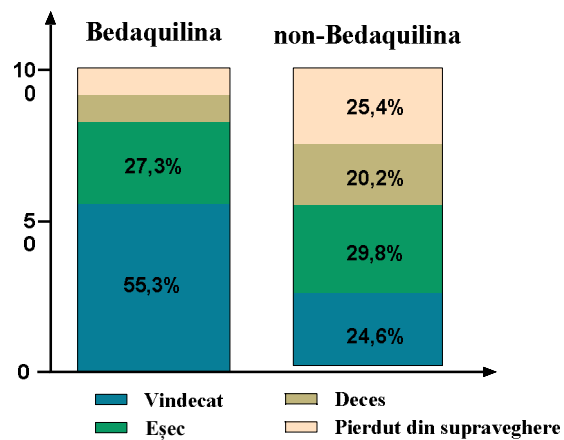
A. Conversia culturii sputei



B. Reversia culturii sputei



C. Rezultatele tratamentului după OMS



D. Rezultatele tratamentului după TBNET

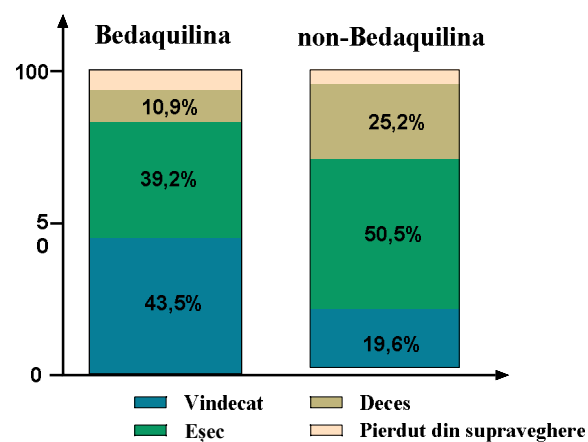


Figura 5.2. Rezultatele tratamentului la bolnavii TB MDR cu și fără badaquilină în schema de tratament

Tabelul 5.2. Medicamentele incluse în schemele de tratament

	Până la potrivirea după scorul de propensiune				După potrivirea după scorul de propensiune			
	Badaquilina (n=115)	Non- Badaquilina (n=1954)	P	DMS	Badaquilina (n=114)	Non- Badaquilina (n=114)	p	SMD
Fluorochinolone	97 (83,4%)	1873 (95,9%)	<0,0001	0,39	96 (84,2%)	100 (87,7%)	0,4	0,10
Capreomicina	87 (75,7%)	1817 (93,0%)	<0,0001	0,49	86 (75,4%)	93 (81,6%)	0,3	0,15
Amikacina	7 (6,1%)	151 (7,7%)	0,5	0,06	7 (6,1%)	5 (4,4%)	0,5	0,08
Linezolid	98 (85,2%)	851 (43,5%)	<0,0001	0,96	98 (86,0%)	103 (90,4%)	0,3	0,14
Etionamida	66 (57,4%)	1585 (81,1%)	<0,0001	0,53	65 (57,0%)	65 (57,0%)	1,000	<0,001
Cicloserina	112 (97,4%)	1910 (97,8%)	0,8		111 (97,4%)	111 (97,4%)	1,000	
Imipenem	62 (53,9%)	252 (12,9%)	<0,0001	0,96	62 (54,4%)	62 (54,4%)	1,000	<0,001
PAS	54 (47%)	1123 (57,5%)	0,03	0,53	54 (47,4%)	51 (44,7%)	0,7	<0,001
Pirazinamida	111 (96,5%)	1915 (98%)	0,3	0,09	110 (96,5%)	110 (96,5%)	1,000	<0,001
Etambutol	2 (1,7%)	235 (12,0%)	0,0007	0,41	2 (1,8%)	1 (0,9%)	0,6	0,08
Izoniazida (doze crescute)	30 (26,1%)	231 (11,8%)	<0,0001	0,37	29 (25,4%)	23 (20,2%)	0,3	0,12
Clofazimina	10 (8,7%)	9 (0,5%)	<0,0001	0,4	9 (7,9%)	5 (4,4%)	0,3	0,15
Delamanid	3 (2,61%)	3 (0,15%)	<0,0001	0,21	3 (2,6%)	2 (1,8%)	0,6	0,06

DMS - diferența medie standardizată

management al cazului de tuberculoză MDR, printr-o abordare individualizată în cazurile cu ameliorare radiologică lentă, în special în cazurile cu cavități persistente, precum și în cele cu sputoculturi pozitive la termenul de 5-6 luni de tratament, sau în cazurile cu eșecuri repetate ale tratamentului pentru tuberculoza MDR.

În cazul a 15 bolnavi administrarea badaquilinei a fost întreruptă în primele 20 de săptămâni (la 10 bolnavi a fost stopată la solicitarea pacientului, la 4 bolnavi a fost decizia medicului pneumoftiziolog din ambulatoriu și într-un caz din cauza reacțiilor adverse).

Reacțiile adverse asociate administrării badaquilinei

Din baza de date SIME-TB au putut fi identificate doar reacțiile adverse care au dus la stoparea administrării medicamentului. Astfel 55 de astfel de evenimente au fost înregistrate la 43 (37,8%) dintre bolnavii din cohorta badaquilină și 50 de episoade la 38 (43,8%) de bolnavi în cohorta nonebdachilină. Dintre acestea doar unul a fost asociat cu badaquilina, fiind vorba despre un caz de sindrom comițial după 7 săptămâni de administrare a medicamentului. La nici unul din pacienții care au administrat badaquilină (n=114) nu a fost înregistrată prelungirea critică a intervalului QT (QTc > 500 ms).

Rezultatele tratamentului

Rata de conversie a sputei la 6 luni de la inițierea tratamentului MDR la bolnavii care au primit scheme de tratament care includeau badaquilina a fost semnificativ mai mare comparativ cu cohorta non-badaquilină (66,7% versus 40,3%, $p < 0,001$, **Tabelul 5.3**). La fel, conversia sputei în cohorta badaquilină a fost atinsă semnificativ mai rapid comparativ cu cohorta non-badaquilină (până la termenul de o lună [0-1] versus 1 [0-3] lună, $p < 0,001$, **Figura 5.2**).

La aprecierea rezultatelor finale ale tratamentului în baza criteriilor OMS (2014) în cohorta badaquilină a fost găsită o rată mai mare a tratamentului de succes și mai redusă a mortalității comparativ cu cohorta non-badaquilină (55,3% versus 24,6%, $p < 0,001$ și respectiv 8,8% versus 20,2%, $p < 0,001$). În același timp, rata eșecului a fost similară (27,2% versus 29,8%, $p = 0,7$).

Aprecierea rezultatelor finale ale tratamentului în cohortele studiate în baza criteriilor TBNET a fost posibilă în 92/114 (80,7%) dintre bolnavi în cohorta badaquilină și 107/114 (88,6%) bolnavi în cohorta non-badaquilină. În acest caz bolnavii din cohorta badaquilină, la fel, au avut o rată mai mare de vindecare și rată mai mică de deces, respectiv 43,5% versus 19,6% ($p=0,004$) și 10,9% versus 25,2% ($p=0,01$, **Tabelul 5.3**).

Rata tratamentului de succes la pacienții anamnestic de eșec al tratamentului tratați cu scheme ce conțin badaquilina

În cohorta badaquilinei a fost incluși 58 (50,9%) de bolnavi cu istoric de cel puțin a unui episod de eșec al tratamentului tuberculozei MDR. Rata de conversie a sputei la termenul de 6 luni de la inițierea tratamentului la acești bolnavi a constituit 55,2% (32/58), iar rata de vindecare a constituit 41,4% (24/58) conform criteriilor OMS și 31,4% (61/51) conform criteriilor TBNET (Tabelul 5.4).

Tabelul 5.3. Rezultatele tratamentului conform definițiilor OMS (2014) și TBNET în cohorta badaquilină și non badaquilină

	Badaquilina (n=114)	non- Badaquilina (n=114)	p	RR (95%Î)
Rata de conversie a sputei la 6 luni	76 (66,7%)	46 (40,3%)	<0,001	1,65 (1,27-2,16)
Rezultatele finale ale tratamentului după OMS				
Vindecăt	63 (55,3%)	28 (24,6%)	<0,001	2,25 (1,58-3,25)
Eșec	31 (27,2%)	34 (29,8%)	0,7	0,91 (0,60-1,37)
Deces	10 (8,8%)	23 (20,2%)	<0,001	0,43 (0,22 – 0,85)
Pierdut din supraveghere	10 (8,8%)	29 (25,4%)	<0,001	0,34 (0,17-0,65)
Rezultatele finale ale tratamentului după TBNET #				
Vindecăt	40 (43,5%)	21 (19,6%)	0,004	2,21 (1,43-3,48)
Eșec	36 (39,2%)	54 (50,5%)	0,1	0,77 (0,56-1,06)
Deces	10 (10,9%)	27 (25,2%)	0,01	0,43 (0,22-0,82)
Pierdut din supraveghere	6 (6,5%)	5 (4,7%)	0,4	2,32 (1,21-4,52)

- 92 de cazuri în cohorta badaquilină și 107 în cohorta non-badaquilină (cazurile care nu au fost incluse cu au încheiat supraveghere în perioada de post tratament de un 1 an, la momentul colectării datelor primare).

Rata de conversie a sputoculturi la 6 luni de tratament la bolnavii tratați cu badaquilină fără istoric de eșec al tratamentului MDR a constituit 82,1% (56 pacienți), iar rata de vindecare - 69,9% (39/56) apreciată după definițiile OMS și 58,5% (24/41) apreciată după criteriile TBNET (Tabelul 5.4), ambii parametri fiind semnificativ mai buni decât la bolnavii cu istoric de eșec al tratamentului ($p = 0,003$ și $p = 0,01$, respectiv).

Tabelul 5.4. Rezultatele tratamentului conform definițiilor OMS (2014) și TBNET la bolnavii cu și fără de anamnestice de tuberculoză în cohorta badaquilină

	Cu istoric de eșec al tratamentului (n=58)	Fără istoric de eșec al tratamentului (n=56)	p
Rata de conversie a sputei la 6 luni	32 (55,2%)	44 (78,6%)	0,007
Rezultatele finale ale tratamentului după OMS			
Vindecăt	24 (41,4%)	39 (69,6%)	0,003
Eșec	22 (37,9%)	9 (16,1%)	0,01
Deces	4 (6,9%)	6 (10,7%)	0,5
Pierdut din supraveghere	8 (13,8%)	2 (3,6%)	0,09
Rezultatele finale ale tratamentului după TBNET[#]			
Vindecăt	16 (31,4%)	24 (58,5%)	0,01
Eșec	26 (50,1%)	10 (24,4%)	0,01
Deces	4 (7,8%)	6 (14,6%)	0,3
Pierdut din supraveghere	5 (9,8%)	1 (2,4%)	0,2

[#] - 51 de cazuri în cohorta cu istoric de eșec și 41 de cazuri în cohorta fără de eșec (cazurile care nu au fost incluse cu au încheiat supraveghere în perioada de post tratament de un 1 an, la momentul colectării datelor primare).

5.1.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor obținute

În prezentul capitol au fost evaluate rezultatele tratamentului la pacienții cu tuberculoză MDR în Republica Moldova care au primit badaquilină comparat cu rezultatele tratamentului la pacienții cu tuberculoză MDR schemele de tratament ale cărora nu au inclus badaquilina. Scopul acestei evaluări a fost verificarea eficacității terapeutice a badaquilinei, anterior demonstrată în studii clinice randomizate, în condițiile utilizării badaquilinei în practica clinică curentă într-o zonă cu povară înaltă a tuberculozei MDR. În rezultatul analizei efectuate a fost demonstrat că pacienții tratați cu scheme de tratament care conțin badaquilină ating mai rapid conversia culturii sputei și au o rată mai înaltă de conversie la 6 luni de tratament, o rată mai mare de vindecare și o rată mai mică a mortalității, comparat cu cei fără de badaquilină în schema de tratament.

În alte studii care au evaluat eficacitatea badaquilinei rata conversiei sputei la termenul de 6 luni de tratament a variat între 64-100%, iar rata tratamentului de succes între 52-85%, ambele variabile fiind semnificativ mai mari la bolnavii care au primit badaquilină versus cei cu tratament fără de badaquilină [166, 254, 256–259]. Similar în analiza prezentată, pacienții tratați cu

badaquilină au avut o rată mai înaltă a conversiei sputei și a tratamentului de succes decât cei fără de badaquilină. Valoarea adăugată a acestor date rezidă în posibilitatea de a contrapune rezultatele tratamentului (atât intermediare cât și finale) obținute la bolnavii cu badaquilină cu o cohortă de bolnavi comparabili, după parametrii clinici și epidemiologici de bază, care au primit îngrijirile medicale în condițiile ”de rutină” ale aceluiași sistem medical. Lipsa unui astfel grup de comparație era anunțat printre limitările studiilor dedicate acestui subiect [258, 260, 261]. Astfel, rezultatele obținute demonstrează eficacitatea și fezabilitatea utilizării schemelor de tratament care conțin badaquilină, la utilizarea în condiții programatice, într-o regiune cu rată înaltă a tuberculozei MDR.

Rata tratamentului de succes observată în prezenta cohortă este printre cele mai reduse comparativ cu cea din alte studii (55,3%), chiar dacă schemele de tratament au inclus linezolid și imipenem, medicamente care, la fel, se asociază cu o rată mai bună a tratamentului de succes [262]. Aceasta în mare parte a putut fi condiționat de faptul că pacienții din ambele cohorte analizate în acest studiu pot fi caracterizați ca pacienți extremi de dificili. Astfel, 73% dintre bolnavi erau infectați cu tulpini de *M. tuberculosis* cu rezistență adițională la fluorochinolone, 81% prezentau leziuni cavitare, iar 80% erau cu istoric de cel puțin un episod precedent de tuberculoză, toți acești factori asociindu-se cu rezultate proaste ale tratamentului la bolnavii cu tuberculoză MDR [262]. Cu toate acestea rezultatele mai proaste ale tratamentului observate în cohortele analizate ar putea fi cauzate și de aderența redusă la tratament în cadrul actualului episod de boală, aceasta considerând faptul că 64% dintre bolnavii studiați sunt cazuri după eșec al tratamentului precedent. Pentru ameliorarea aderenței la tratamentul tuberculozei, pe parcursul ultimilor ani în Republica Moldova au fost implementate mai multe intervenții, extinderea și fortificarea lor ar putea contribui la diminuarea nonaderenței [191, 263].

Unul dintre factorii care potențial ar fi putut influența rezultatul tratamentului este o eventuală diferență în durată de spitalizare a bolnavilor din cele două cohorte. Din păcate, datorită caracterului retrospectiv al acestei analize, aceste informații nu au fost disponibile pentru interpretare. În consecință acest aspect a fost trecut pe lista limitelor prezentului studiu.

Pentru evaluarea rezultatelor tratamentului la bolnavii studiați au fost aplicate definițiile Protocolului clinic național, care sunt în conformitate cu cele ale OMS, și definițiile TBNET [264]. Aplicarea definițiilor TBNET a permis evaluarea potențialelor recidive ale bolii pe parcursul primului an de la finalizarea tratamentului. Rata mai mare a cazurilor de eșec la evaluarea în baza criteriilor TBNET a fost dată în special de cazurile pierdute din supraveghere, care aveau sputocultură pozitivă la reluarea tratamentului după mai multe luni de întrerupere, aspect observat și în alte cohorte [265].

În studiile de faza IIB aplicarea badaquilinei în tratamentul bolnavilor cu tuberculoză MDR a fost asociat cu un risc sporit de deces [254]. Cu toate acestea datele ulterioare au demonstrat o letalitate semnificativ mai joasă la bolnavii tratați cu scheme cu badaquilină comparativ cu schemele standard de tratament [266]. Datele analizei incluse în prezenta lucrare, la fel, sugerează o mortalitate joasă la pacienții tratați cu badaquilină. Acest aspect este descris pentru prima dată la bolnavii tratați în cadrul programelor de control al tuberculozei în Europa de Est, fiind anterior raportat în cohorta națională din Africa de Sud.

În țările din Estul Europei accesul limitat la medicamentele antituberculoase este un fenomen frecvent [201]. Utilizarea redusă a delamanidului și a clofaziminei în ambele cohorte studiate reflectă aceeași realitate din perioada de desfășurare a studiului. Printre cauzele de bază de acces întârziat la medicamentele antituberculoase aprobate de către OMS, în țări precum Republica Moldova, frecvent este finanțarea insuficientă a sistemului de sănătate și în consecință gradul sporit de dependență de finanțarea din partea donatorilor internaționali, iar în unele cazuri nivelul exagerat al birocrăției și inerția autorităților [267]. Astfel, badaquilina a devenit accesibilă pentru prima dată în Republica Moldova doar în septembrie 2016, la trei ani de la aprobarea internațională. Cu toate acestea o dată cu creșterea gradului de permisivitate a utilizării badaquilinei din partea OMS s-a observat o creștere semnificativă a disponibilității medicamentelor precum badaquilina, clofazimina sau delamanidul, ceea ce oferă speranțe privitor la creșterea în viitor a ratei tratamentului de succes la bolnavii cu tuberculoză MDR.

Unul dintre punctele mai puțin optimiste ale datelor prezentate în contextul acestui studiu, este dat de rata foarte înaltă a cazurilor în care badaquilina a fost inclusă de una singură în schema de tratament (în caz de rezistență sau reacții adverse la alt medicament). Această situație potențial este secundară accesului limitat la spectrul complet de medicamente antituberculoase în țări precum Republica Moldova. Cu toate acestea trebuie conștientizat faptul riscului sporit de generare rapidă a rezistenței la badaquilină asociat cu o asemenea practici în farmacoterapia tuberculozei MDR [268]. Datorită caracterului retrospectiv al acestei analize (respectiv a lipsei datelor privitor la TSM-ul pacienților pe parcursul tratamentului) în prezenta lucrare nu a fost posibil aprecierea rezistenței dobândite față de badaquilină. Un alt factor de risc sporit pentru dezvoltarea rezistenței la badaquilină, în cohorta studiată, este dat de întreruperea într-un număr semnificativ de bolnavi a tratamentului cu badaquilină doar după câteva săptămâni de terapie (14 bolnavi, 12,3%). Diversificarea spectrului de medicamente antituberculoase disponibile și îmbunătățirea managementului cazurilor de tuberculoză MDR în special la etapa de ambulatoriu este esențială pentru prevenirea dezvoltării rezistenței față de noile medicamente antituberculoase în Republica Moldova, precum și în alte țări din regiune.

Informația, doar parțială privitor la efectele adverse asociate tratamentului antituberculos la bolnavii studiați limitează concluziile privitor la tolerabilitatea generală a medicației cu badaquilină. Rata generală joasă a tuturor reacțiilor adverse observată în ambele cohorte studiate mai curând este determinată de raportarea incompletă a reacțiilor adverse în baza de date utilizată în acest studiu. În același timp, datele disponibile confirmă frecvența redusă a efectelor cardiotoxice asociate badaquilinei, chiar la utilizarea în combinație și cu alte medicamente care pot determina prelungirea intervalului QT. Această observație corespunde și altor date din literatură dedicate acestui subiect [269], suplimentar confirmând riscul redus a efectelor adverse cardiace inclusiv la utilizarea medicamentului în condiții programatice.

5.2 Utilizarea izoniazidei în tratamentul bolnavilor cu tuberculoză multidrog rezistentă

Una dintre schemele recomandate pentru tratamentul tuberculozei MDR, la ora actuală de către OMS, are o durată standard de 9 luni și conține medicamente cu administrare exclusiv per os, inclusiv badaquilina administrată 6 luni. Afară de badaquilină în primele 4-6 luni de tratament schema mai include levo-/moxifloxacină, etionamidă, etambutol, izoniazidă (în doze mari 15-20 mg/kg) pirazinamidă și clofazimină, iar în următoarele 5 luni - levo-/moxifloxacină, clofazimină, etambutol și pirazinamidă. La fel, etionanamida poate fi substituită cu linezolidul (600 mg zilnic) pentru o durată de 2 luni. Această recomandare este bazată pe rezultatele utilizării acestei scheme în practica curentă în Africa de Sud precum și pe meta-analiza datelor individuale a unei cohorte combinate de pacienți cu tuberculoză MDR efectuată de către OMS [270, 271].

Contraindicațiile de bază pentru utilizarea acestui regim de tratament sunt date de expunerea anterioară la medicamentele antituberculoase utilizate în tratamentul tuberculozei MDR, rezistența demonstrată față de medicamentele incluse în schema terapeutică (în special față de fluorochinolone), precum și severitatea bolii. În acest context sunt firești ezitățile de aplicare empirică (anterior cunoașterii rezultatelor TSM) a acestei scheme de tratament în țările din Regiunea Europeană a OMS. Aceasta datorită faptului că tulpinile MDR de *M. tuberculosis* din această arie geografică se caracterizează printr-o frecvență înaltă a rezistenței adiționale la medicamentele antituberculoase (complementar celei la izoniazidă și rifampicină). Din analiza rezultatelor TSM fenotipice rezultă că mai puțin de 10% dintre bolnavii cu tuberculoză MDR din această regiune ar fi eligibili pentru schema de tratament amintită [272].

Rezistența față de izoniazidă a tulpinilor de *M. tuberculosis* este cauzată fie de mutații în gena katG fie de mutații din gena inhA. În cazul mutațiilor în inhA rezistența tulpinilor de *M. tuberculosis* față de izoniazidă este una "joasă" spre deosebire de mutațiile din katG, care se

asociază cu un grad înalt de rezistență. Altfel spus, în cazul mutațiilor în inhA concentrația minimă inhibitorie (CMI) a izoniazidei este mai mare decât la tulpina de referință (sensibilă față de izoniazidă), dar mai mică decât la tulpinile cu mutații în katG. Astfel, utilizarea unor doze ușor crescute de izoniazidă ar putea depăși CMI în cazul mutațiilor în inhA și ar avea efect bactericid asupra tulpinilor respective [273]. Prin urmare utilizarea dozelor sporite de izoniazidă la bolnavii cu tuberculoză MDR (prin definiție rezistentă la izoniazidă) este argumentată doar în cazul în care rezistența față de acest medicament este condiționată de mutații în gena inhA și este inutilă și potențial periculoasă în cazul tulpinilor cu mutații în katG. În analiza inclusă în acest capitol este analizată raționalitatea aplicării empirice a izoniazidei în doze mari (15-20 mg/kg) în tratamentul tuberculozei MDR inclusiv ca parte a schemei orale de tratament de 9 luni.

5.2.1. Material și metodă

Pentru a determina numărul bolnavilor cu tuberculoză MDR la care ar fi argumentat tratamentul cu doze mari de izoniazidă în Republica Moldova, a fost analizat spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă la tulpinile de *M. tuberculosis* cu pattern MDR prin aplicarea testelor PCR de hibridizare liniară și a secvențierii de nouă generație a ADN-ului micobacterian.

Identificarea tulpinilor de M. tuberculosis testate prin PCR prin hibridizare liniară

În studiu au fost incluse rezultatele tuturor examinărilor rezistenței genotipice prin metoda Genotype MTBDR plus ver.1 (Hain Life Science, Nehren, Germany) a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis*, care conform protocoalelor Laboratorului Național de Referință în micobacteriologia tuberculozei (LNR) au fost examinate în perioada 2010 - 2016 în cadrul LNR. Datele au fost extrase din registrele respective ale LNR în care sunt păstrate bandelele de celuloză de pe care sunt citite rezultatele testării prin Genotype MTBDR plus. În scopul prezentului studiu aceste bandetele au fost evaluate de novo, în special apreciată sensibilitatea genotipică față de izoniazidă.

Testul Hain MDR-TB plus (Nehren, Germany) este un test hibridizare liniară, care include următoarele etape de efectuare: a) extragerea ADN-lui din materialul cultivat pe medii lichide/solide sau din materialul nativ (probele decontaminate de spută atât BAAR pozitive cât și negative) de la bolnavul/persoana suspectă; b) amplificarea multiplexă cu ajutorul primerilor și ADN-polimerazei termostabile; c) revers-hibridizarea; d) citirea rezultatelor. Hibridizarea include următoarele etape: denaturarea chimică a produselor amplificării, hibridizarea lanțurilor monocatenare a amplicoanelor marcate cu biotină (ADN-sonde) cu probele de ADN legate de membrana nitrocelulozică (bandetele), spălarea minuțioasă, adăugarea conjugatului fosfatază

alcalină/streptavidină, reacția în prezența fosfatazei alcaline în urma căreia apar benzile respective pe bandele. Fiecare dintre etapele enumerate au fost efectuat de către personalul instruit de laborator conform procedurilor operaționale standard în vigoare și recomandărilor OMS [123, 235].

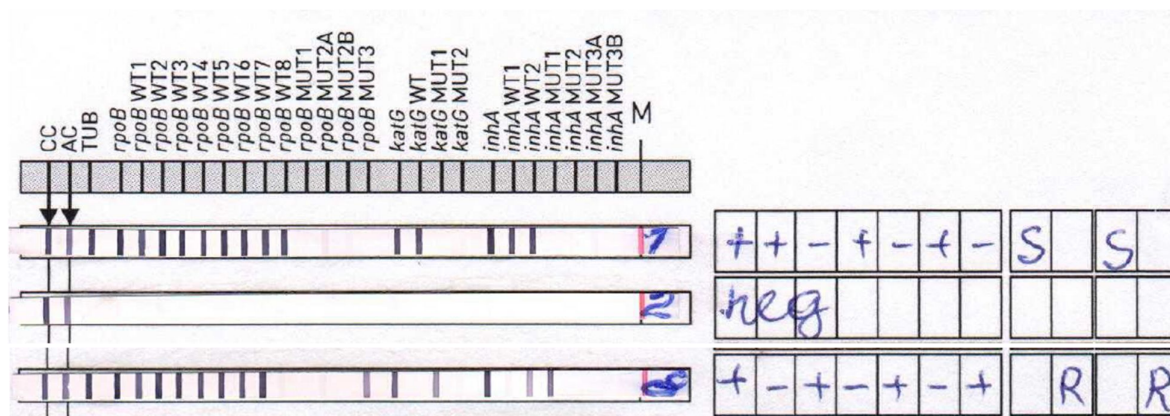


Figura 5.3 Citirea rezultatelor testelor LPA Hain MDR-TB plus (Nehren, Germany). Imaginile din figură ilustrează rezultatul evaluării sensibilității la rifampicină (în baza genei *rpoB*) și la izoniazidă (în baza genelor *katG* și *inhA*). Testele confirmă rezistența pentru izoniazidă și rifampicină. Despre sensibilitatea față de medicament se decide în baza prezenței tuturor benzilor colorate (rezultatul amplificării și hibridizării ADN) corespunzătoare tipului sălbatic al genei (*wild type* - WT). În cazul lipsei uneia dintre benzile WT și/sau apariției unei benzi corespunzătoare tipului mutant al genei (MUT), se conchide despre prezența rezistenței. Astfel, în cazul rifampicinei (*rpoB*) lipsește banda corespunzătoare *rpoB*WT8 și este prezentă banda *rpoB*MUT3, ceea ce atestă rezistența față de acest medicament. Celelalte benzi (CC, A, M) servesc pentru validarea testului, în timp ce banda TUB confirmă identificarea *M. tuberculosis*.

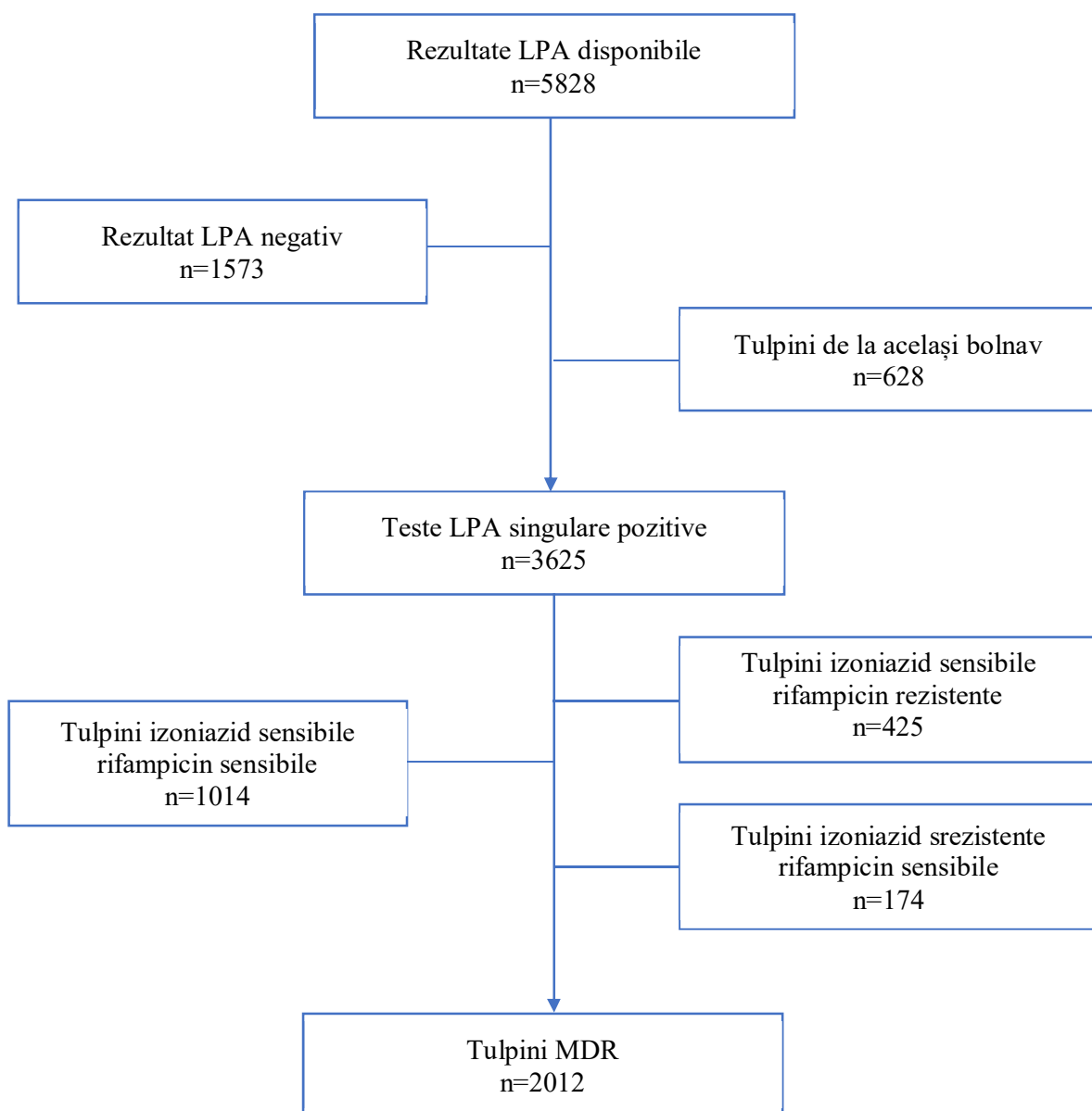


Figura 5.4. Identificarea tulpinilor de *M. tuberculosis* pentru testare PCR prin hibridizare liniară.

Citirea rezultatelor LPA a fost efectuată vizual, conform recomandărilor producătorului, fiecare bandetă fiind examinat independent de 2 evaluatori (**Figura 5.3**). În caz de divergențe a concluziilor de interpretare a rezultatului, bandetele respective au fost discutate, iar decizia privind rezultatul final a fost luată prin acordul comun al ambilor evaluatori.

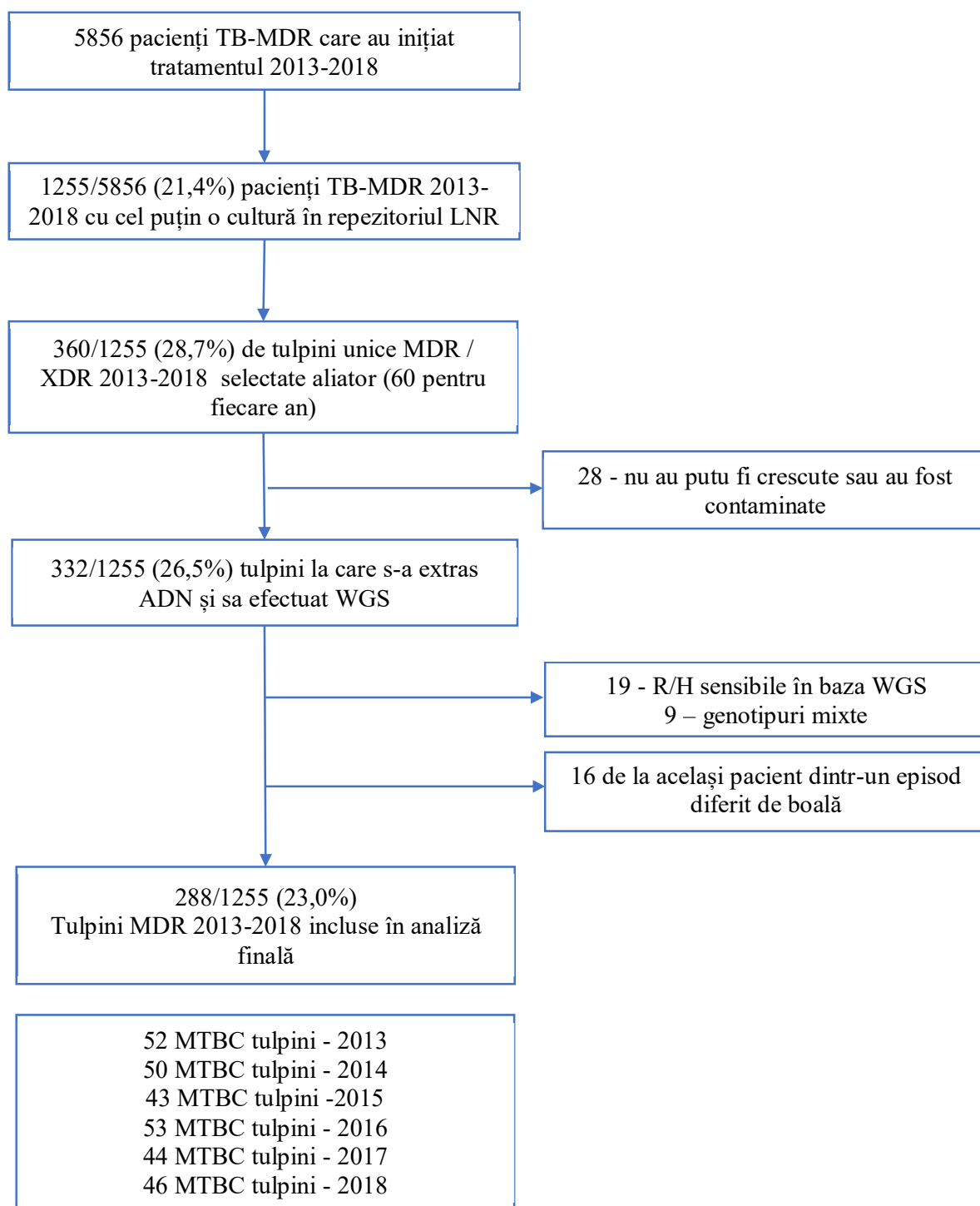


Figura 5.5. Selectarea tulpinilor de *M. tuberculosis* pentru testare prin secvențierea de nouă generație a ADN-ului micobacterian

Identificarea tulpinilor de M. tuberculosis testate prin secvențierea de noua generație a ADN-ului micobacterian

Pentru evaluarea spectrului mutațiilor asociate cu rezistență la izoniazidă prin metoda de secvențiere a genomului micobacterian din repozitoriul LNR au fost selectate randomizat câte 60 de tulpini de *M. tuberculosis* pentru fiecare an din perioada 2013-2018. Selectarea randomizată a fost efectuată prin funcția "ddply" a pachetului "plyr" a programului statistic R. Tulpinile selectate (n= 360) au fost recultivate pe mediul de cultură Lowenstein-Jensen conform protocolului standard al LNR [235]. Din tulpinile recultivate (n=332) a fost izolat ADN-ul micobacterian și a fost efectuată secvențierea de nouă generație (NGS) a fragmentelor de ADN de interes pentru studiu. Tulpinile determinate în baza NGS ca tulpini cu o posibilă infecție mixtă (n=9), cele cu mutații filogenetice heterogene [274] sau cele fără de determinate genetice a rezistenței față de izoniazidă și rifampicină [275] (n=19), au fost excluse din studiu. La fel, în 16 cazuri s-a dovedit a fi că același bolnav a avut câte două tulpini în setul de tulpini selectate, din două episoade diferite de boală, în aceste cazuri din analiză au fost excluse tulpina din ultimul episod cronologic.

Extragerea ADN- ului micobacterian pentru secvențierea de noua generație

Tulpinile de *M. tuberculosis*, selectate din repozitoriul LNR au fost inoculate pe mediul Lowenstein - Jenses și incubate la temperatura de 37°C până la vizualizarea certă a coloniilor, după care acestea au fost transferate și centrifugate în microtuburi de 2 ml care conțineau 400 μl de buffer TE, iar ulterior încălzite până la 80°C și menținute la această temperatură timp de 20 minute (pentru omorârea bacteriilor). După 3 min de centrifugare la gradientul de 13,000 g a fost înlăturat supernatantul, adăugate 400 μl de buffer TE și vortexat pentru separarea celulelor. Ulterior a fost adăugat câte 50 μl de lizozim (10 mg/ml), ușor vortexat și incubat pe parcursul nopții la temperatura de 37°C. În ziua următoare au fost adăugate 70 μl soluție SDS 10%, 5 μl proteinază K (10 mg/ml), vortexat ușor și incubat timp de 10 minute la temperatura de 65°C. După aceasta a fost adăugat amestec 750 μl cloroform/ alcool isoamilic (24:1), tubul întors de câteva ori și centrifugat la temperatura camerei timp de 15 minute la gradientul de 13,000 g. Supernatantul apos a fost transferat într-un alt tub de microcentrifugare și 0,6 din volumul de isopropanol a fost adăugat pentru precipitarea acizilor nucleici timp de 30 minute la temperatura de -20°C. Ulterior a fost supus centrifugării timp de 10 minute la temperatura camerei la gradientul de 13,000g, înlăturat supernatantul și spălat ADN-ul în 0,5 ml de etanol rece 75% cu întoarcerea de câteva ori a tubului, urmat de centrifugare în decurs de 5 minute la temperatura camerei și înlăturarea supernatantului. ADN-ul a fost uscat la temperatura de 60°C în decurs de 10 minute după ce a fost

dizolvat în 100 µl de buffer-TE la temperatura de 37°C timp de 30 minute până la dizolvarea completă.

Secvențierea de noua generație

ADN-ul micobacterian extras a fost secvențiat la Centrul din cercetări din Borstel, Germania, fiind efectuată secvențierea întregului genom micobacterian. În prezenta lucrare au fost analizate doar fragmentele genomice cunoscute de a fi asociate cu rezistența la izoniazidă. Secvențierea a avut o acoperire medie a genomului de 50x, fiind utilizată biblioteca de perechi-terminale de ADN cu aplicarea tehnologiei Illumina (Nextera-XT and NextSeq500) în conformitate cu recomandările producătorului. Datele secvențieri (Fast files) au fost cartografiate în baza genomului de referință H37Rv utilizând MTBseq pipeline [276].

Pentru prezicerea rezistenței genotipice la izoniazidă au fost considerate mutațiile (polimorfismele nucleotidice unice (SNPs), inserțiile sau delețiile) în gena katG și inhA cu o acoperire de cel puțin o citire în ambele direcții (forward and reverse) și o citire de detectare a alelei corespunzătoare cu un scor phred de minim 20. Predicția rezistenței genotipice a fost efectuată în baza catalogului de mutații deținut de Centrul de cercetări din Borstel la data de 3 iulie 2020 [275].

Analiza statistică

Prelucrarea statistică a inclus statistici descriptive ale variabilelor categoriale de interes.

5.2.2 Spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă la tulpinile MDR de *M. tuberculosis* în Republica Moldova

Rezultatele aprecierii prin PCR cu hibridizare liniară

În cardul studiului au fost analizate rezultatele 3625 rezultate singulare (un pacient un rezultat) pozitive a testelor LPA (**Figura 5.4**). În cazul a 2012 tulpini analizate au fost identificate mutații asociate cu rezistență atât față de izoniazidă cât și rifampicină (tulpini MDR). În 1980/2012 (98,4%) dintre tulpini a fost prezentă mutația în gena katG în poziția 315, asociată cu un nivel înalt de rezistență față de izoniazidă. Doar în 17/2012 (0,8%) dintre tulpinile analizate mutațiile rezistente au fost localizate în promotorul genei inhA (fără mutație concmitentă în katG). În 15/2012 (0,7%) dintre tulpini localizarea mutației nu a putut fi stabilită prin intermediul LPA (**Tabelul 5.5**).

Concomitent rezultatele LPA au evidențiat spectrul mutațiilor asociate cu rezistența tulpinilor de *M. tuberculosis* la rifampicină. Astfel, în marea majoritate a cazurilor (80,2%) rezistența la rifampicină este condiționată de mutația rpoB 531L, în celelalte tulpini rezistența la rifampicină a fost condiționată de mutațiile rpoB 526Y, rpoB 526D, rpoB 516V (**Tabelul 5.5**).

Tabelul 5.5. Rezistența genotipică față de izoniazidă și rifampicină a *M. tuberculosis* cu pattern MDR în Republica Moldova apreciată prin PCR prin hibridizare liniară

Rezultatele LPA	n	%	95%Î
Rezultate unice pozitive	3625	-	
Tulpini izoniazid sensibile rifampicin sensibile	1014	28,0	26,5-29,4
Tulpini izoniazid rezistente rifampicin sensibile	425	11,7	10,7-12,8
Tulpini izoniazid sensibile rifampicin rezistente	174	4,8	4,1-5,4
Tulpini izoniazid rezistente rifampicin rezistente (MDR)	2012	55,5	53,8-57,1
Rezistența la izoniazidă în tulpinile MDR			
katG315T fără mutații cunoscute în inhA	766	38,1	35,9-40,2
inhA8C sau 8A sau 15T sau 16G fără mutații cunoscute în katG	17	0,8	0,5-1,3
katG315T+ inhA8C sau 8A sau 15T sau 16G	1214	60,3	58,2-62,4
MDR fără mutații cunoscute în katG sau inhA	15	0,7	0,4-1,2
Rezistența la rifampicină în tulpinile MDR			
rpoB 531L	1614	80,2	78,4-81,9
rpoB 526Y	63	3,1	2,4-3,9
rpoB 526D	5	0,2	0,1-0,5
rpoB 516V	53	2,6	2,0-3,4
Mutații multiple în rpoB	110	5,5	4,5-6,5
MDR fără mutații cunoscute în rpoB	167	8,3	7,1-9,5

Rezultatele aprecierii prin secvențiere de noua generație a genomului micobacterian

La examinarea prin secvențiere spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la izoniazidă, la fel, în majoritatea covârșitoare a cazurilor (99,7%) a fost determinată de mutații în gena katG (izolat sau în asociere cu mutații în inhA), rezistența față de izoniazidă determinată exclusiv de mutații în gena inhA a fost prezentă doar la o tulpină dintre cele analizate (**Tabelul 5.6.**). De menționat că în acest caz mutația clasică din promotorul genei inhA (15C-T) a fost însoțită și de mutația în regiunea codificatoare a genei inhA (I194T).

Tabelul 5.6. Rezistența genotipică față de izoniazidă a *M. tuberculosis* cu pattern MDR în Republica Moldova apreciată prin secvențierea de nouă generație

Rezultatele secvențierii	n	%	95%ÎÎ
Tulpini izoniazid rezistente, rifampicin rezistente (MDR)	288	-	-
Rezistența la izoniazidă în tulpinile MDR			
katG315T fără mutații cunoscute în inhA	122	42,4	36,7-48,1
inhA8C sau 8A sau 15T sau 16G fără mutații cunoscute în katG	1	0,3	0,01-1,9
katG315T+ inhA 15T sau 17T	165	57,3	51,5-62,8

5.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării spectrului mutațiilor asociate cu rezistența fenotipică la izoniazidă

În analiza prezentată a fost stabilit că majoritatea covârșitoare a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis* în Republica Moldova au mutații în gena katG, care sunt asociate cu niveluri înalte ale concentrației medii inhibitorii (CMI) ale acestui medicament.

La ora actuală conform Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), concentrația CMI pentru tulpinile sensibile față de izoniazidă constituie 0,2 mg/l în mediul lichid Middlebrook 7H10, iar concentrația de 1,0 mg/l este definită ca una care corespunde unei rezistențe joase față de izoniazidă și care potențial ar putea fi depășită prin aplicarea unor doze majorate de medicament (15-20 mg/kg) [277]. Testările pe tulpinile sălbatice de *M. tuberculosis* evidențiază o valoare CMI pentru izoniazidă, care variază între 0,032-0,125 mg/l. În același timp, din datele de literatură tulpinile rezistente la izoniazidă cu mutația katG 315T au un CMI între 3 și 32 mg/l în mediul lichid Midlebrook 7H10, pentru majoritatea tulpinilor acesta depășind 8mg/l [278]. Astfel, în cazul tulpinilor de *M. tuberculosis* cu mutații katG315T CMI apreciată *in vitro* depășește de circa 30 de ori concentrațiile observate (și recomandate pentru aplicare) în cazul tulpinilor sensibile. Acest fapt zădărnicește administrarea dozelor mari de izoniazidă în cazurile de tuberculoză MDR cauzate de tulpini cu mutații în katG.

În 2016, în urma unei serii de studii efectuate în Asia și Africa, OMS a aprobat pentru tratamentul tuberculozei MDR o schemă standardizată de tratament cu o durată de 9-12 luni, aceasta considerabil mai scurtă comparativ cu singura opțiune de până atunci de 18-24 luni. Ulterior schema inițială (4-6 Gfx(Mxf),Km,Pto(Eto),Clf,H_{doze mari},Z,E/5 Gfx(Mxf),Clf,Z,E) a suferit unele modificări în sensul excluderii Gfx, înlocuirii Km cu Am (ca ulterior și aceste medicamente să fie excluse), includerea badaquilinei și eventual substituirea Pto(Eto) cu linezolid.

Cu toate modificările suportate schema s-a menținut în fiecare dintre edițiile ulterioare ale ghidului de tratament al tuberculozei MDR emis de OMS, inclusiv în ultima ediție din 2022. De fiecare dată recomandarea utilizării acestei scheme standarde a fost condiționată de o serie de criterii de eligibilitate printre care lipsa expunerii anterioare la medicamentele antituberculoase utilizate în tratamentul tuberculozei MDR, confirmarea sensibilității la fluorochinolone și lipsa leziunilor pulmonare extinse și a afectării extrapulmonare severe. În acest context, chiar începând cu primele rapoarte privitor la eficacitatea acestei scheme standard a fost pusă la îndoială aplicabilitatea ei în Regiunea Europeană. Astfel mai multe publicații analizând rezultatele testelor de sensibilitate fenotipică față de medicamentele antituberculoase din această zonă geografică au atenționat asupra ratei sporite de rezistență adițională a tulpinilor MDR, fapt care face non-eligibili pentru acest tratament mai mult de 90% dintre bolnavii cu tuberculoză MDR [272]. Rezultatele prezentate mai sus oferă încă un argument, de data aceasta din perspectiva substratului genotipic al rezistenței micobacteriene, care rezidă în ineficiența includerii izoniazidei în această schemă de tratament standard. Astfel, considerarea acestui argument genotipic descalifică până la 98-99% dintre bolnavii de tuberculoză MDR din Republica Moldova pentru acest regim terapeutic.

Un alt aspect, complementar subiectului discutat, este aplicabilitatea în Republica Moldova a dozelor crescute de izoniazidă în tratamentul bolnavilor cu tuberculoză cu rezistență la izoniazidă, dar sensibile la rifampicină (tulpini izoniazid-rezistente). Recomandările actuale privitor la tratamentul tuberculozei izoniazid-rezistente includ schema standard de tratament cu rifampicină, pirazinamidă, etambutol și levofloxacină, pentru o durată de 6 luni [177]. În același timp, ghidul aduce în discuție posibilitatea indicării izoniazidei în doze mari în cazurile în care rezistența este condiționată de mutații în gena *inhA* (fără a face recomandări expres în acest sens). În contextul Republicii Moldova rezultatele evaluării de mai sus arată o rată extrem de mică a bolnavilor cu tuberculoză la care administrarea dozelor mari de izoniazidă este rațională din punct de vedere al mecanismelor de rezistență la antibacteriene.

La prima etapă a acestei lucrări aprecierea rezistenței genotipice a tulpinilor micobacteriene a fost realizată prin testul comercial Genotype MTBDR plus ver. 1 (Hain LifeScience, Nehren, Germany). Acesta este un dispozitiv diagnostic destinat laboratoarelor specializate, pe bază de real time PCR cu hibridizare liniară (Line Probe Assay), care permite identificarea unui set de mutații prestabilite de producător. Astfel, unele mutații mai puțin frecvente ar putea scăpa identificării exacte. În cohorta analizată rata mutațiilor neidentificate în tulpinile MDR pentru izoniazidă a constituit 0,7% iar pentru rifampicină 8,3%. De acest gen de "imperfecțiuni" sunt marcate toate dispozitivele de identificare a rezistenței genotipice pe baza reacție de amplificare a acizilor nucleici. Remarcabil în acest sens este cazul tulpinilor MDR din

eSwatini, unde mai mult de 50% dintre tulpinile MDR au rezistență la rifampicină determinată de mutația *rpoB* I491F, care se află în afara regiunii RRDR (Rifampicin resistance determining region) în consecință nefiind incorporată în testele de apreciere a rezistenței fenotipice aplicate în practica curentă (precum testul Xpert MTB/Rif). Soluția tehnologică pentru evitarea rezultatelor fals negative privitor la rezistența față de medicamentele antituberculoase (secundar nedepistării prin PCR) este implementarea tehnicilor de secvențiere a genomului micobacterian. Utilizarea secvențierii de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS) permite identificarea cu acuratețe considerabil mai mare a spectrului de mutații asociate cu rezistența la preparatele antituberculoase. Pentru implementarea în practica curentă deosebit de promițătoare sunt dispozitivele de secvențiere a regiunilor de interes sporit (amplicon based sequencing). Recent au fost raportate rezultatele testării clinice a unui astfel de dispozitiv (Deeplex TB) care permite secvențierea regiunilor genomice asociate cu rezistența la toate cele 15 medicamente anti-MDR utilizate la ora actuală și oferă o citire ușoară, inclusiv pentru clinician, a pattern-ului de rezistență.

Interpretarea datelor prezentate în cadrul acestui subcapitol ar putea fi mai incitantă în cazul contrapunerii mutațiilor identificate cu rezultatele testării fenotipice a sensibilității cu aplicarea unui spectru larg de CMI. Datorită caracterului retrospectiv al analizei prezentate acest deziderat nu fost posibil de realizat și trebuie trecut pe lista limitelor cercetării. Cu toate acestea, rezultatele prezentate au fost obținute în urma analizei sistematice și standardizate ale rezultatelor testelor moleculare de precizie a rezistenței la antibiotice, pe un lot impunător de tulpini cu pattern MDR, ceea ce ne-a permis să răspundem obiectiv la întrebarea de cercetare formulată privitor la gradul de argumentare a administrării empirice a tratamentului cu doze mari de izoniazidă la bolnavii cu tuberculoză MDR în Republica Moldova.

5.3 Concluzii la capitolul 5

1. Pacienții cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă, tratați în condiții programatice în Republica Moldova, care au primit scheme de tratament care conțin badaquilină, au o rată mai mare și mai rapidă de conversie a culturii sputei, dar și o rată mai mică de reversie la cultura pozitivă comparativ cu cei schema de terapie a căroră nu include acest medicament.

2. La pacienții cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă, inclusiv la cei cu eșec al tratamentului precedent, tratați în condiții programatice în Republica Moldova cu scheme de tratament ce conțin badaquilină, rata de tratament de succes este de două ori mai mare comparativ cu pacienții fără de badaquilină în schema de terapie.

3. La bolnavii cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă, inclusiv la cei cu eșec al tratamentului precedent, tratați în condiții programatice în Republica Moldova cu scheme de

tratament ce conține badaquilina, rata de deces este de două ori mai mică comparativ cu pacienții fără de badaquilină în schema de terapie.

4. În majoritatea absolută a cazurilor rezistența la izoniazidă a tulpinilor multidrog rezistente de *M. tuberculosis* din Republica Moldova sunt determinate de mutații în gena *katG*, izolat sau în combinație cu mutații în promotorul *inhA*, asociate cu un nivel înalt de rezistență față de acest medicament, fapt care compromite administrarea empirică a izoniazidei în doze mari în tratamentul tuberculozei multidrogrezistente.

6. REZULTATELE TRATAMENTULUI ANTITUBERCULOS - FACTORI DE PROGNOSTIC ȘI OPȚIUNI DE EVALUARE

6.1 Impactul funcției pulmonare asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză

La ora actuală este unanim acceptat faptul că tuberculoza este o boală care poate fi vindecată (cu excepțiile de rigoare pentru tuberculoza MDR). Cu toate acestea, un număr semnificativ de pacienți vindecați de tuberculoză rămân cu importante sechele pulmonare, atât imagistice cât și funcționale [279, 280]. Pattern-ul disfuncției pulmonare la acești bolnavi poate fi atât obstructiv cât și restrictiv în ambele cazuri fiind semnificativ afectată calitatea vieții pacientului. În același context trebuie menționat faptul că la majoritatea bolnavilor cu afectarea posttuberculoasă a funcției pulmonare, aceasta din urmă este alterată deja la momentul stabilirii diagnosticului [281, 282]. Disfuncția pulmonară prezentă la momentul diagnosticării tuberculozei ar putea avea impact asupra rezultatelor tratamentului, similar cum se întâmplă la bolnavii cu pneumonii sau BPOC [283, 284]. O asemenea asociere în cazul bolnavilor cu tuberculoză este foarte puțin studiată, probabil datorită restricțiilor impuse de controlul infecției în timpul examinărilor funcției pulmonare. În prezentul capitol sunt prezentate rezultatele evaluării impactului funcției pulmonare, apreciate la momentul diagnosticării tuberculozei, asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză pulmonară într-o instituție medicală unde spirometria este efectuată de rutină la toți bolnavii de tuberculoză anterior inițierii tratamentului antituberculos.

6.1.1. Material și metodă

A fost realizat un studiu de cohortă în care retrospectiv au fost analizate datele anonimizate ale tuturor pacienților diagnosticați cu tuberculoză pulmonară confirmată prin cultură, spitalizați pe parcursul anului 2016 în dispensarul antituberculos nr.1 din orașul Harkiv. Această instituție medicală deservește o populație de circa 1,4 milioane de persoane cu o incidență a tuberculozei de 48 cazuri la 100.000 populație. Datele primare utilizate în analiza efectuată au fost extrase de către personalul autorizat (profesor Dmytro Butov) din sistemul informațional al instituției medicale în baza unui chestionar prestabilit în formă tabelară și după anonimizare a fost preluat pentru analiza ulterioară.

Cadrul studiului

În conformitate cu prevederile ghidului național de management al tuberculozei din Ucraina toate persoanele cu diagnostic prezumtiv de tuberculoză sunt direcționați la consultația

ftiziatrului. Acesta, de regulă, în scop diagnostic efectuează testele microbiologice de rigoare, examenul radiografic al cutiei toracice precum și unele testele biologice de sânge. În cazul confirmării tuberculozei, pacientul începe tratamentul fie în ambulatoriu (de regulă în cazurile relativ ușoare de boală), fie în condiții specializate de spital (în cazurile mai extinse de boală). Spitalizarea este efectuată până la obținerea conversiei sputei. Evaluarea funcției pulmonare nu este recomandată de ghidul național de management al tuberculozei în Ucraina. Cu toate acestea, conform protocolul instituțional al Dispensarului antituberculos nr. 1 din Harkiv spirometria este recomandată la evaluarea inițială a bolnavilor de tuberculoză supravegheați în această instituție.

Examinările microbiologice

Examinările microbiologice considerate în studiu au fost cele standard efectuate la internare, 2 și 6 luni, pentru bolnavii cu tuberculoză sensibilă și lunar pentru bolnavii cu tuberculoză cu rezistență la rifamicină sau cei MDR. Testele microbiologice efectuate au inclus microscopia la BAAR (colorație Zhiel-Neelsen) și cultura pentru *M. tuberculosis* pe mediu solid (Lowenstein-Jensen). Testarea prin Xpert MTB/Rif a fost efectuată după caz la internare. La fel, la internare a fost efectuat testul de sensibilitate la medicamente (TSM) pe medii solide și lichide (în caz de disponibilitate). Spectrul medicamentelor față de care a fost testată sensibilitatea a inclus: izoniazida, rifampicina, ofloxacină, levofloxacină, moxifloxacină, cicloserina, pirazinamida, etambutolul, streptomycină, etionamida, amikacină, capreomicină, kanamicină și PAS (acid para-amino salicilic).

Examinarea radiologică

În contextul diagnosticării tuberculozei pulmonare la toți pacienții incluși în studiu a fost efectuată radiografia toracică în incidență postero-anterioară. Computer tomografia toracică a fost efectuată la unii pacienți, când aceasta era necesară în scop diagnostic. Cu toate acestea din cauza caracterului retrospectiv al analizei efectuate descrierea radiografiei toracice nu a fost disponibilă pentru o eventuală corelare a leziunilor imagistice cu parametrii funcției pulmonare.

Evaluarea funcției pulmonare

Evaluarea funcției pulmonare a fost efectuată cu spirometrul SPIROCOM (XAI-Medica, Harkiv, Ucraina) în conformitate cu recomandările ATS/ERS [285]. Tipul disfuncției pulmonare (obstructiv, restrictiv sau mixt) a fost definit în conformitate cu criteriile Strategiei ATS/ERS pentru interpretare rezultatelor spirometriei [286]. Examinarea prin bodyplethismografie pentru aprecierea volumelor pulmonare nu au fost efectuată la pacienții examinați în cadrul studiului. Toate spirometriile au fost efectuate de către un asistent medical instruit cu o experiență de peste

20 de ani în efectuarea spirometriei. În conformitatea cu protocolul instituțional al Dispensarului antituberculos nr.1 din Harkiv în timpul efectuării spirometriei la bolnavii cu tuberculoză sunt aplicate următoarele măsuri de control al infecției: utilizarea pieselor bucale și a filtrelor interioare din tubulatura proximală de unică folosință, purtarea măștilor de către personalul implicat în efectuarea spirometriei, precum și de către pacienții din camera de așteptare, utilizarea spirometrului exclusiv pentru bolnavii de tuberculoză, programarea exactă a orei de efectuare a testului pentru prevenirea aflării concomitente a unui număr mare de persoane în camera de așteptare, programarea pacienților cu microscopie pozitivă doar după testarea tuturor bolnavilor cu microscopie negativă.

Tratamentul antituberculos

În perioada inițierii tratamentului la bolnavii înrolați în studiu, bolnavii diagnosticați cu tuberculoză cu rezistență la rifampicină în baza testului Xpert MTB/Rif, au primit scheme standarde de tratament care includeau o fluorochinolonă (moxifloxacină sau levofloxacină), aminoglicozidă injectabilă (capreomicină sau kanamicină), pirazinamidă, etionamidă, cicloserină și PAS. Schemele de tratament puteau suferi ajustări după obținerea rezultatelor TSM. Pacienții la care testul Xpert MTB/Rif nu a fost efectuat, inițiau tratamentul standard pentru tuberculoza sensibilă, care putea fi modificat (eventual trecut pe tratamentul pentru tuberculoza MDR) la obținerea rezultatelor TSM. În cazul bolnavilor cu tuberculoză sensibilă a fost administrată schema standard cu izoniazidă, rifampicină, etambutol și pirazinamidă.

Evaluarea rezultatelor tratamentului

Rezultatele tratamentului au fost apreciate în baza definițiilor OMS (2014) [183]. Eșecul tratamentului și decesul bolnavului au fost considerate drept rezultate negative ale tratamentului. Vindecarea și tratamentul complet au fost considerate rezultate pozitive ale tratamentului.

Analiza statistică

În cadrul analizei efectuate variabilele continue au fost prezentate ca medii cu deviații standard, iar variabilele categoriale ca valori absolute și procentuale. Pentru compararea valorilor medii și a celor procentuale a fost aplicat respectiv testul t-student și χ^2 . Pentru a aprecia asocierea independentă dintre tipul disfuncției pulmonare și rezultatele negative ale tratamentului antituberculos a fost generat un model de regresie logistică în care în calitate de co-factori au fost evaluați următoarele variabile: genul, vârsta, IMC, statutul HIV, microscopia sputei și pattern-ul de rezistență la medicamente.

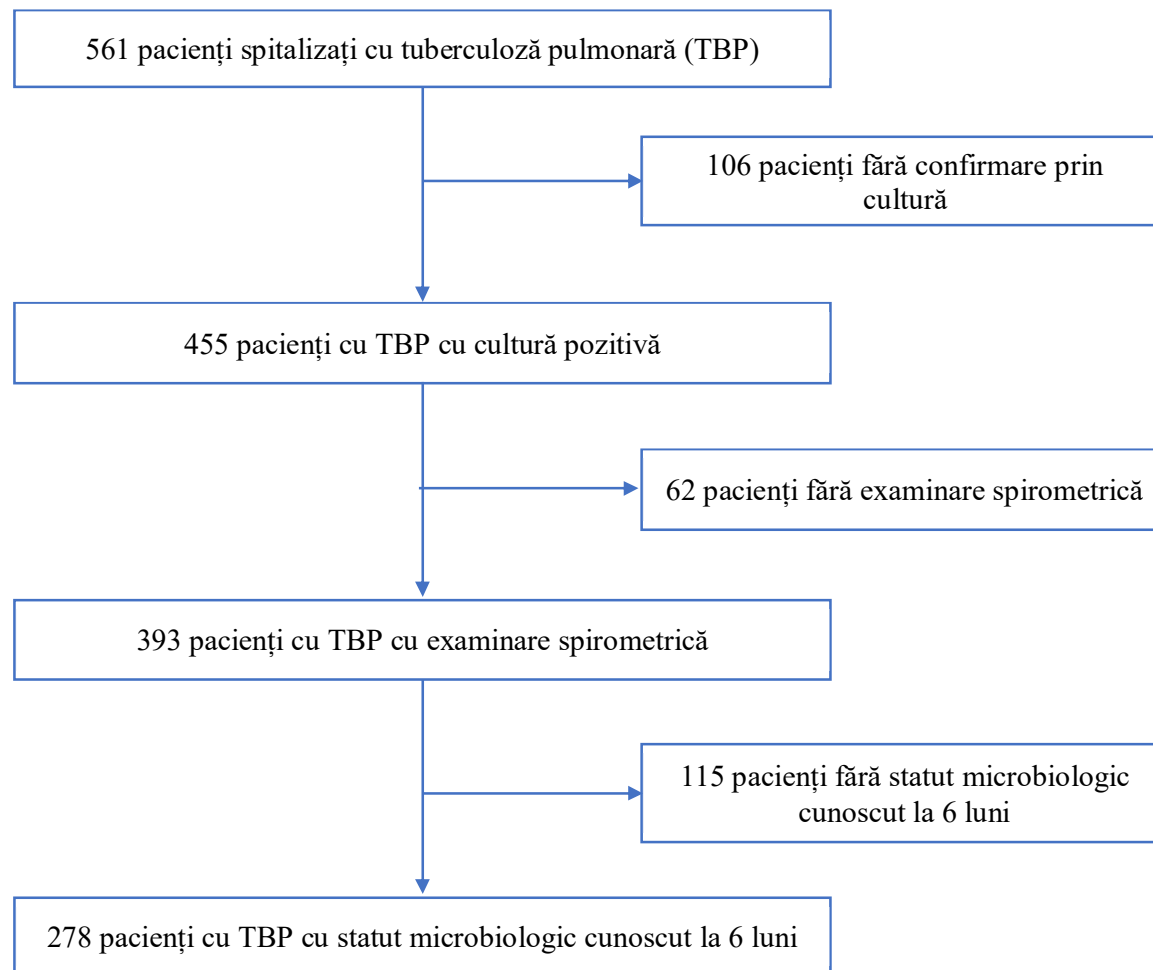


Figura 6.1. Identificarea cohorței analizate de bolnavi cu tuberculoză pulmonară cu examinarea funcției pulmonare la momentul stabilirii diagnosticului.

6.1.2 Tipul disfuncției pulmonare și asocierea cu rezultatele tratamentului

Caracteristica generală a cohorței analizate

În anul de referință pentru prezentul studiu (2016) în Dispensarul anti-tuberculos nr.1 din Harkiv au fost internați 516 pacienți cu tuberculoză pulmonară. În 18,9% (106/561) dintre aceștia diagnosticul nu a fost confirmat prin cultură, motiv pentru care nu au fost incluși în analiza finală. La fel, 62 de bolnavi au fost excluși din studiu din motivul lipsei rezultatelor spirometriei, iar alții 115 datorită lipsei informației privitor la conversia sputei la termenul de 6 luni. Astfel, în analiza finală au fost incluși 278 de bolnavi (**Figura 6.1**). Vârsta medie a pacienților incluși în studiu a constituit $41,7 \pm 12,3$ ani, 71,4% dintre care erau bărbați (**Tabelul 6.1**). Media indicelui masei corporale a bolnavilor a fost de $21,1 \pm 3,5$. La momentul diagnosticării bolii, 69,8% dintre bolnavi au avut rezultat pozitiv la microscopiei sputei la BAAR, iar la 44,6% (124/278) dintre bolnavi fost confirmată multidrog rezistența tulpinii de *M. tuberculosis*. În 42 (33,9%) dintre tulpinile MDR a fost confirmată și rezistența adițională la fluorochinolone. În o cincime dintre cazuri bolnavii analizați au avut istoric de tuberculoză în trecut, iar 5,4% dintre pacienți erau HIV infectați. Pe lângă infecția HIV, 18% dintre pacienții din studiu aveau sau/și alte comorbidități: diabet zaharat - 18 bolnavi, alcoolism cronic - 13, hepatită virală cronică - 6, utilizatori de droguri intravenoase - 4, astm bronșic - 3, ulcer gastric - 2, câte un bolnav a avut cancer, artrită reumatoidă, tromboembolism pulmonar, sifilis.

Funcția pulmonară

Valorile medii a ale indicilor spirometrici de bază la bolnavii incluși în studiu sunt prezentate în **tabelul 6.1**. Parametrii spirometrici au fost în limite normale la 26,6% dintre bolnavi, 63,3% au prezent disfuncție de tip restrictiv, 4,3% - obstructiv, iar 5,8% dintre pacienți au avut un pattern mixt al disfuncției pulmonare conform datelor spirometriei.

Rata pattern-urilor funcționale la pacienții cu tuberculoză nonMDR a fost similar cu cel la bolnavii cu tuberculoză MDR - tipul restrictiv 62,3% versus 64,5%, $p = 0,8$; tipul obstructiv 2,6% versus 6,5%, $p = 0,1$; tipul mixt 5,8% versus 5,6%, $p = 1,0$. La fel, rata pacienților cu spirometrie normală a fost similară la bolnavii nonMDR versus cei MDR - 29,2% versus 23,4%, $p=0,6$. La capitolul severității modificărilor observate, gradul de reducere a volarilor medii a VEMS și FVC a fost comparabil la bolnavii nonMDR versus cei MDR, respectiv $CVF \geq 80\%$ - 31,8% versus 29,8%, $p = 0,8$; $79\% > CVF \geq 60\%$ - 40,9% versus 41,9%, $p = 0,9$; $59\% > CVF \geq 40\%$ - 20,1% versus 23,4%, $p = 0,6$; $CVF < 40\%$ - 7,2% versus 4,9%, $p = 0,5$; la fel și pentru

VEMS: VEMS $\geq 80\%$ - 52,6% versus 46,8%, $p = 0,4$; $80\% > \text{VEMS} \geq 50\%$ - 32,5% versus 41,1%, $p = 0,2$; VEMS $< 50\%$ - 14,9% versus 12,1%, $p = 0,6$.

Tabelul 6.1. Caracteristicile clinico-demografice și spirografice ale lotului de studiu

	n (%)	95%ÎÎ
Gen masculin	206 (74,1)	68,6-78,8
Vârsta ani (media $\pm$ DS)	41,7 $\pm$ 12,3	40,2-43,1
Indicele masei corporale (media $\pm$ DS)	21,1 $\pm$ 3,5	20,6-21,5
HIV pozitiv	15 (5,4)	3,3-8,7
Microscopia BAAR pozitivă	194 (69,8)	64,1-74,8
Rezistență MDR	82 (29,5)	24,4-35,1
Rezistență MDR + Fluorochinolone	42 (15,1)	17,9-30,3
Tipul cazului de tuberculoză		
Nou	215 (77,3)	72,1-81,8
Recidivă	48 (17,3)	13,2-22,1
după Pierdere din supraveghere	9 (3,2)	1,7-6,0
după Eșec	6 (2,2)	1,0-4,6
Pattern-ul funcției pulmonare		
Normal	74 (26,6)	21,7-32,1
Obstructiv	12 (4,3)	2,4-7,3
Restrictiv	176 (63,3)	57,5-68,7
Mixt	16 (5,8)	3,5-9,1
Indicatorii spirometrici		
CVF (L) (media$\pm$ES)	3,3 $\pm$ 0,7	3,2-3,4
CVF (%) (media$\pm$ES)	71,6 $\pm$ 1,2	69,2-74,1
VEMS (L) (media$\pm$ES)	2,9 $\pm$ 0,06	2,7-3,0
VEMS (%) (media$\pm$ES)	79,0 $\pm$ 1,4	76,3-82,0
PEF (L/s) (media$\pm$ES)	4,9 $\pm$ 0,1	4,7-5,2
PEF (%) (media$\pm$ES)	56 $\pm$ 1,3	53,4-58,6
VEMS/CVF (media$\pm$ES)	0,87 $\pm$ 0,007	0,85-0,88

ES – eroare standard, DS – deviația standard.

Rezultatele tratamentului în cohorta generală

Rata de conversie a sputei la luna a doua și a șasea de tratament a constituit respectiv 27,3% (76/278) și 68,7% (191/278). Rezultatele finale ale tratamentului au inclus pacienți vindecați - 50,7% (141/278), pacienți cu tratament complet - 23,4% (65/278), pacienți cu eșec al tratamentului - 14,7% (41/278), pacienți pierduți din supraveghere - 5,03% (14/278) și cazuri de deces - 6,1% (17/278).

Rezultatele tratamentului după tipul disfuncției pulmonare

Rata tratamentului de succes a fost mai înaltă la bolnavii cu spirometrie normală decât la cei cu disfuncție de tip restrictiv (87,8% versus 68,8%, $p = 0,003$) sau mixt (87,8% versus 62,5%, $p = 0,04$). În același timp, rata tratamentului de succes la bolnavii cu spirografie normală nu a fost semnificativ diferită de cea la bolnavii cu modificări obstructive (87,8% versus 83,3%, $p = 0,07$) (**Figura 6.2**). De remarcat numărul mic de bolnavi cu disfuncție de tip obstructiv ($n=12$) identificați în cohorta de studiu. La fel, nu au fost observate diferențe statistice semnificative în rata tratamentului de succes între grupurile de bolnavi cu diferite tipuri de modificări ale funcției pulmonare.

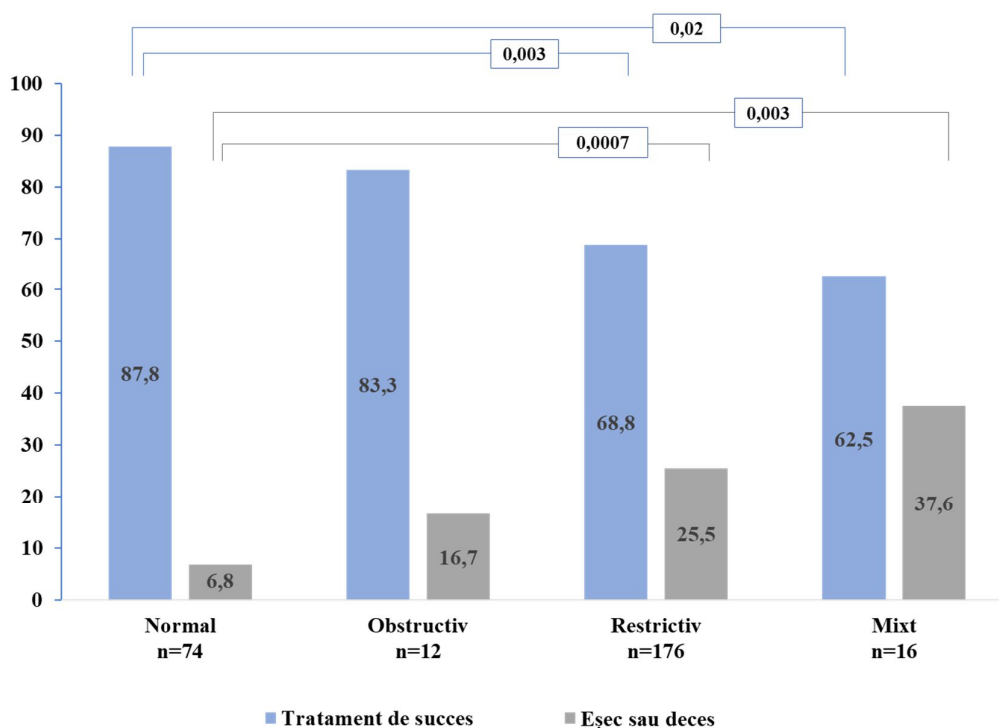


Figura 6.2. Rezultatul tratamentului în dependență de pattern-ul funcției pulmonare
(valorile p ne indicate sunt mai mari de 0,05)

Rata cazurilor cu eșec al tratamentului antituberculos la bolnavii cu spirometrie normală a fost semnificativ mai joasă decât în oricare dintre cele trei grupuri cu disfuncție pulmonară: restrictiv - 5,4% versus 17,0%, $p = 0,01$; obstructiv - 5,4% versus 16,7%, $p = 0,02$; sau mixt - 5,4% versus 31,3%, $p = 0,008$.

Rata mortalității la pacienții cu spirometrie normală nu a fost semnificativ diferită de pacienții cu modificări restrictive (1,4% versus 8,5%, $p = 0,07$), de tip mixt (1,4% versus 6,3%, $p = 0,6$) sau obstructive (1,4% versus 0%, $p = 0,07$). La fel, nu au fost observate diferențe statistice semnificative între grupurile de bolnavi cu diferite tipuri de disfuncție pulmonară (restrictiv versus obstructiv, $p = 0,6$; mixt versus obstructiv, $p = 0,04$; restrictiv versus mixt, $p = 0,7$).

Rata rezultatului negativ ale tratamentului antituberculos (eșec și deces) a fost mai mare la bolnavii cu disfuncție pulmonară restrictivă sau mixtă comparativ cu cei cu spirometrie normală (25,6% versus 6,8%, $p = 0,0007$ și respectiv 37,5% versus 6,8%, $p = 0,003$). În același timp, diferențele în rata rezultatului negativ al tratamentului antituberculos la bolnavii cu disfuncție obstructivă comparativ cu cei cu spirometrie normală sunt ne semnificative (16,7% versus 6,8%, $p = 0,5$) (Figura 6.2).

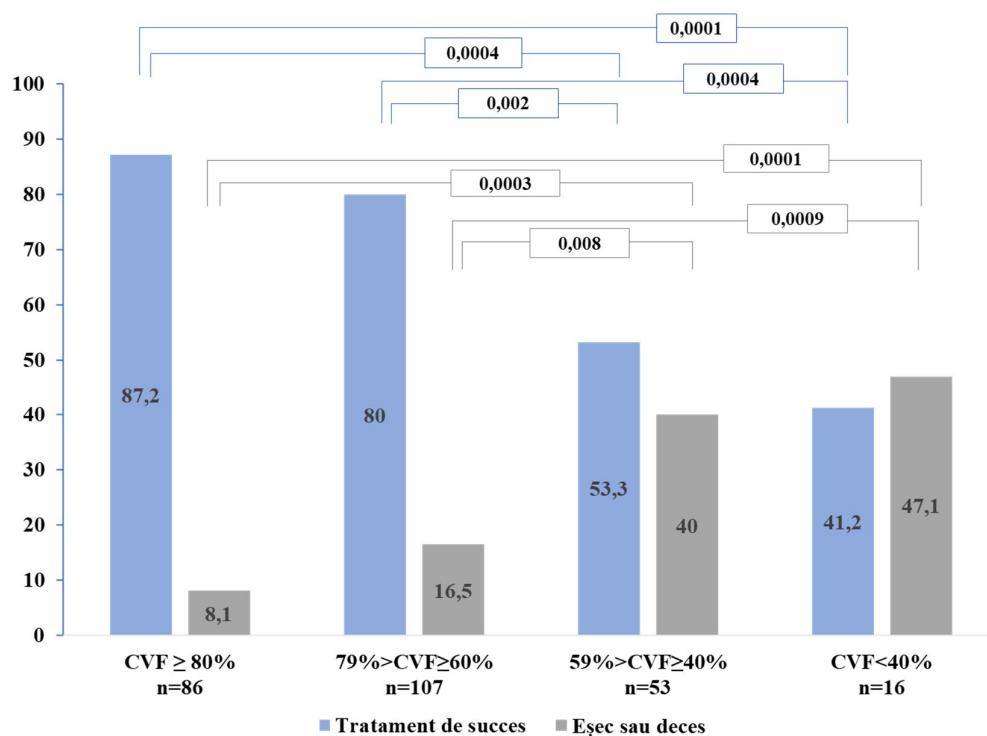


Figura 6.3. Rezultatele tratamentului stratificat după severitatea restricției
(valorile p ne indicate sunt mai mari de 0,05)

Tabelul 6.2. Caracteristicile clinico-demografice și ale funcției pulmonare la bolnavii cu rezultate negative și pozitive ale tratamentului

	Rezultat negativ al tratamentului* n=58	Rezultat pozitiv al tratamentului* n=206	p
	n (%)	n (%)	
Sex masculin	47 (81,0)	150 (72,8)	0,2
Vârsta ani (media ± DS)	45,3 ± 12,4	40,8 ± 12,0	0,01
Indicele masei corporale (media ± DS)	20,3 ± 3,8	21,4 ± 3,3	0,05
HIV pozitiv	3 (5,2)	11 (5,3)	0,9
Microscopia BAAR pozitivă	46 (79,3)	135 (65,5)	0,05
Rezistență MDR	36 (62,1)	76 (36,9)	0,0006
Rezistență MDR + Fluorochinolone	16 (27,6)	21 (10,2)	0,0008
Tipul cazului de tuberculoză			
Nou	33 (56,9)	174 (84,5)	0,0001
Recidivă	19 (32,8)	25 (12,1)	0,0002
după Pierdere din supraveghere	3 (5,2)	5 (2,4)	0,3
după Eșec	3 (5,2)	2 (1,0)	0,1
Pattern-ul funcției pulmonare	5 (8,6)	65 (31,5)	0,0009
Normal	2 (3,4)	10 (4,9)	1,0
Obstructiv	45 (77,6)	121 (58,7)	0,009
Restrictiv	6 (10,3)	10 (4,9)	0,1
Mixt			
Indicatorii spirometrici	2,8 ± 1,1	3,5 ± 1,1	<0,003
CVF (L) (media±DS)	60,2 ± 20,1	75,2 ± 19,7	0,004
CVF (%) (media±DS)	2,3 ± 0,9	3,0 ± 1,0	<0,001
VEMS (L) (media±DS)	65,7 ± 21,7	83,2 ± 22,6	<0,001
VEMS (%) (media±DS)	4,2 ± 2,0	5,2 ± 2,1	0,002
PEF (L/s) (media±DS)	47,0 ± 20,4	58,6 ± 21,5	<0,001
PEF (%) (media±DS)	0,86 ± 0,1	0,87 ± 0,1	0,5

În cazul în care bolnavii au fost stratificați după gradul de severitate a declinului CVF (în calitate de marker al severității restricției) bolnavii cu CVF între 59% - 40% au avut o rată mai mică a tratamentului de succes decât cei cu un CVF între 79% - 60% sau cei cu un CVF $\geq 80\%$, respectiv, 41,2% versus 80,0%, $p = 0,0001$ și 41,2% versus 87,2%, $p = 0,2$ (**Figura 6.3**). Rata rezultatelor negative ale tratamentului (eșec și deces) a fost mai mică la bolnavii cu CVF $\geq 80\%$ și la cei cu CVF între 79% - 60% în comparație cu bolnavii cu CVF 59% - 40%, (respectiv, 8,1% versus 40,0%, $p = 0,0003$ și 16,5% versus 40,0%, $p = 0,008$) și cei cu CVF $< 40\%$ (respectiv, 8,1% versus 47,1%, $p = 0,0001$ și 16,5% versus 47,1%, $p = 0,0009$) (**Figura 6.3**).

Tabelul 6.3. Asocierea dintre parametrii clinici și ai funcției pulmonare cu rezultatul negativ al tratamentului la bolnavii cu tuberculoză pulmonară
(rezultatele analizei prin regresie logistică multiplă).

	OR (95%ÎÎ)	p
Sex masculin	1,68 (0,74 – 4,06)	0,2
Vârsta	1,03 (1,00 – 1,06)	0,03
Indicele masei corporale	0,92 (0,82 – 1,02)	0,1
HIV pozitiv	0,78 (0,16 – 3,00)	0,7
Microscopie BAAR pozitivă	1,95 (0,91 – 4,42)	0,09
Rezistența MDR	2,56 (1,26 – 5,28)	0,01
Tipul cazului de tuberculoză		
Nou		
Recidivă	2,54 (1,12 – 5,70)	0,02
după Pierderea din supraveghere	1,98 (0,32 – 10,74)	0,4
după Eșecul tratamentului	5,78 (0,80 – 51,35)	0,08
Pattern-ul funcției pulmonare		
Normal		
Obstructiv	2,42 (0,28 – 15,49)	0,4
Restrictiv	4,19 (1,60 – 13,28)	0,007
Mixt	5,46 (1,28 – 24,44)	0,02

Asocierea dintre tipul disfuncției pulmonare și rezultatele tratamentului antituberculos

Pe lângă diferențele în parametrii funcției pulmonare pacienții care au înregistrat tratament de succes s-au diferențiat de cei cu rezultat negativ al tratamentului și din perspectiva a astfel de

variabile precum: vârsta, IMC, statutul pozitiv al microscopiei sputei, pattern-ul de multidrog rezistență și istoricul de tuberculoză (**Tabelul 6.2**). Pentru a testa asocierea independentă dintre acești factori și rezultatele tratamentului antituberculos a fost generat un model de regresie logistică multiplă, care a pus în evidență asocierea dintre disfuncția pulmonară de tip restrictiv (OR 4,19, 95%ÎÎ 1,60-13,28, p=0,007) și cea de tip mixt (OR 5,46, 95%ÎÎ 1,28-24,44, p=0,02) cu rezultatul negativ al tratamentului antituberculos (**Tabelul 6.3**). La fel, a fost confirmată asocierea rezultatului negativ al tratamentului cu astfel de factori precum paternul MDR a tulpinii de *M. tuberculosis* (2,56, 95%ÎÎ 1,26–5,28, p=0,01) și recidiva bolii (2,54, 95%ÎÎ 1,12–5,70, p=0,02).

6.1.3 Interpretarea și sinteza rezultatelor de apreciere a asocierii dintre funcția pulmonară și rezultatele tratamentului antituberculos

Datele prezentate în acest capitol au rezultat din analiza parametrilor clinico-funcționali a unei cohorte unicate de bolnavi cu tuberculoză pulmonară, confirmată prin cultură, în care în regim curent a fost evaluată funcția pulmonară la inițierea tratamentului antituberculos. În rezultat a fost demonstrată asocierea dintre disfuncția pulmonară de tip restrictiv și rezultatul negativ al tratamentului antituberculos, pronosticul nefavorabil al bolii fiind în creștere o dată cu sporirea severității restricției pulmonare.

În literatură pot fi găsite un număr limitat de studii care au evaluat funcția pulmonară la bolnavii de tuberculoză la momentul stabilirii diagnosticului [287–295]. În acestea rata bolnavilor cu diferit tip de disfuncție pulmonară la momentul diagnosticului variază între 62%-95% (în cohorta analizată 74%). Aceste variații ar putea fi explicate pe seama potențialelor diferențe în extinderea și tipului leziunilor radiologice, comorbidități preexistente și timpul diferit de la debutul simptomelor până la diagnosticarea bolii [292, 294].

Compararea directă a frecvenței tipurilor de disfuncție pulmonară în diferite studii este anevoioasă. Aceasta datorită aplicării diferitor criterii pentru a defini pattern-ul obstructiv sau cel restrictiv în cohortele analizate. Cu toate acestea putem face referință atât la cohorte cu predominarea (peste 50%) pattern-ului obstructiv [281, 292] cât și a celui restrictiv [294]. În cazul analizei prezentate, în care a fost evidențiată predominarea cazurilor cu pattern restrictiv, este oarecum neașteptată rată deosebit de joasă a modificărilor obstructive, în condițiile în care este vorba de o populație din Europa de Est, circa o treime din care sunt fumători [296]. Deși cauza unor astfel de rezultate rămâne incertă, o explicație plauzibilă ar putea fi vârsta tânără a pacienților incluși în studiu, la care încă nu s-a dezvoltat obstrucția bronșică ireversibilă asociată fumatului. Rate diferite ale tipului de disfuncție respiratorie sunt observate nu doar la momentul diagnosticului dar și după vindecare (în studiile focusate pe evaluarea pacienților cu sechele

posttuberculoase) [280, 282, 297]. O astfel de heterogenitate a tipurilor de disfuncție pulmonară asociată tuberculozei (atât la momentul diagnosticului cât și post vindecare) ar putea rezulta dintr-o ipotetică varietate a "predispoziție" diferitor indivizi pentru diferite tipuri de disfuncție pulmonară condiționată de determinate genetice ale inflamației, nutriție, extinderea leziunii pulmonare, fumat, abuz de alcool etc. [298].

Asocierea dintre disfuncția pulmonară de tip restrictiv și rezultatul negativ al tratamentului antituberculos nu a fost descrisă anterior. Potențial aceasta se datorează precauțiilor de control al infecției care nu ar permite testarea funcției pulmonare la bolnavii cu tuberculoză activă în multe dintre instituțiile medicale. Dificultățile importante în asigurarea măsurilor de control al infecției tuberculoase, în special în zonele cu incidență înaltă a tuberculozei, sunt unanim recunoscute [299]. Astfel, potențialul risc al transmiterii infecției cu *M. tuberculosis* prin intermediul spirografului nu trebuie subestimate. În acest context este esențială aplicarea de măsuri precum utilizarea pieselor bucale de unică folosință, înlocuirea regulată a filtrelor de aer, separarea fluxului de pacienți în cabinetul de spirometrie etc. [300].

Disfuncția pulmonară de tip obstructiv se asociază cu un pronostic negativ la bolnavii cu pneumonii comunitare [284]. Noi nu am găsit o astfel de asociere la bolnavii de tuberculoză, fapt mai puțin așteptat, în cazul în care abordăm tuberculoza ca un tip special de pneumonie (inflamație alveolară de etiologie infecțioasă). Un pattern inflamator diferit, care duce la necroză și formarea de cavități cu remodelarea fibrotică ulterioară a țesutului pulmonar în cazul tuberculozei, ar putea fi responsabilă de asocierea rezultatelor negative ale tratamentului cu disfuncția de tip restrictiv și nu cu cea de tip obstructiv [298].

Bolnavii de tuberculoză cu afectarea funcției pulmonare la momentul diagnosticului nu doar că au rezultate mai proaste al tratamentului antituberculos, dar pot rămâne și cu sechele funcționale și după vindecarea tuberculozei active, stare tot mai frecvent denumită boală pulmonară posttuberculoasă [301]. Beneficiul intervențiilor de reabilitare pulmonară la bolnavii cu sechele posttuberculoase a fost demonstrat cu mai multe ocazii [302]. Aprecierea funcției pulmonare la bolnavii de tuberculoză ar putea contribui la identificare acelor pacienți care potențial ar putea beneficia, mai mult decât alții, de măsurile de reabilitare pulmonară [303].

În puținele studii dedicate acestui subiect a fost observat faptul că în cazul alterării funcției pulmonare, obiectivizată la etapele inițiale ale bolii, o dată cu vindecarea are loc doar o ameliorare modestă a acestora, iar majoritatea dintre acești bolnavi rămân cu o disfuncție pulmonară restantă cu impact negativ asupra calității vieții [282]. În acest context identificarea de intervenții terapeutice precoce, orientate spre păstrarea sau refacerea funcției pulmonare la acești bolnavi, ar

constitui o prioritate în domeniul reabilitării pulmonare. Astfel, de intervenții ar putea ameliora rezultatele tratamentului bolii și reduce din severitatea sechelelor posttuberculoase.

Printre factorii majori cu impact asupra rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză sunt recunoscuți pattern-ul de rezistență a tulpinii de *M. tuberculosis*, statutul HIV al bolnavului, istoricul de tuberculoză și în mod special prezența leziunilor cavitare. Din păcate în setul de date analizate în această cohortă nu a fost disponibilă informația privitor la leziunile imagistice. La fel, datele privitor la statutul de fumător al bolnavilor nu au fost cunoscute. În aceeași ordine de idei menționăm evaluarea funcției pulmonare doar prin spirometrie fără evaluare bodypletismografică. Toate acestea trebuie asumate ca limite ale studiului efectuat, depășirea cărora ar fi permis o descriere mai nuanțată a problemei, care însă nu reduc din importanța concluziei centrale privitor la asocierea dintre statutul funcției pulmonare și rezultatele tratamentului antituberculos.

6.2 Evaluarea rezultatelor tratamentului tuberculozei multidrogrezistente

În prezent eficacitatea terapiei antituberculoase și rezultatul final al tratamentului sunt apreciate în baza unor criterii indirecte precum atingerea indicatorilor microbiologici (dispariția micobacteriilor din sputa expectorată) și administrarea tuturor dozelor de medicamente din schema terapeutică. Această abordare este impusă de lipsa unor biomarkeri mai specifici, care să confirme eradicarea infecției tuberculoase din organismului bolnavului, statut care ar corespunde vindecării. Odată ce dispariția micobacteriilor din spută nu este echivalentă sterilizării leziunilor tuberculoase durata tratamentului este stabilită în mare parte empiric.

Criteriile pentru evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos, aplicate în marea majoritate a țărilor lumii în prezent, sunt definite de către OMS [16, 196]. În conformitate cu acestea concluzia privitor la vindecarea bolii este stabilită în momentul finalizării terapiei în baza îndeplinirii criteriilor microbiologice. Acestea din urmă frecvent sunt dificil de evaluat din mai multe motive, inclusiv din cauza dispariției la bolnavi a expectorațiilor pe parcursul administrării tratamentului antituberculos. În acest context, considerând specificitatea redusă a criteriilor microbiologice utilizate în aprecierea rezultatelor tratamentului, a fost sugerată ideea de stabilire a rezultatului final al terapiei antituberculoase după o perioadă de supraveghere post-tratament (12 luni post-terapie) complementar indicatorilor microbiologici (conversia definitivă a culturii sputei nu mai târziu de 6 luni de la inițierea terapiei) [264].

În acest capitol este prezentată evaluarea impactului aprecierii rezultatului tratamentului la bolnavii cu tuberculoză nu la finalizarea curei de medicație, dar la termenul de un an de la

încheierea terapiei antituberculoase, în condițiile oferirii îngrijirilor medicale în cadrul programelor de răspuns la tuberculoză din Europa de Est.

6.2.1 Material și metodă

Evaluarea stabilirii rezultatelor definitive ale tratamentului antituberculos cu considerarea monitorizării timp de un an post terapie (criteriile simplificate după TBNET) a fost efectuată prin compararea cu rezultatele apreciate prin intermediul criteriilor utilizate în mod curent (în baza definițiilor OMS). Compararea a fost realizată în două cohorte de bolnavi cu tuberculoză MDR din Europa de Est. Prima cohortă a inclus pacienții cu tuberculoză MDR, care au inițiat tratamentul în perioada 2013-2014 în Republica Moldova, iar a doua cohortă - bolnavii cu tuberculoză, la fel confirmată prin cultură, internați în Dispensarul antituberculos nr.1 din orașul Harkiv, Ucraina pe parcursul anului 2014.

Identificarea cohorței din Republica Moldova

Cohorta moldovenească a fost identificată prin intermediul bazei de date SIME-TB (Sistemul de monitorizare și evaluare a tuberculozei) secțiunea TB 089 în care au fost selectați toți bolnavii adulți cu tuberculoză pulmonară MDR, care au inițiat tratamentul antituberculos în perioada 01.01.2013-31.12.2014. În studiu nu au fost incluse cazurile fără de confirmare microbiologică prin cultură, cazurile pediatrice și cazurile cu afectare exclusiv extrapulmonară, precum și cele pentru care nu a fost disponibile rezultatele culturii sputei la termenul de 6 luni de la inițierea tratamentului. Evoluția post-tratament a fost apreciată, la fel, prin intermediul bazei de date SIME-TB fiind verificată reînregistrarea în aceasta pe parcursul unui an de la finalizarea tratamentului. Ca termen limită pentru evaluarea post-terapeutică a fost considerat 31.12.2017.

Identificarea cohorței din Dispensarul antituberculos nr.1 din Harkiv

Cohorta a fost identificată prin analiza retrospectivă a registrului electronic al Dispensarului regional din orașul Harkiv (instituție de referință în tratamentul tuberculozei în regiunea Harkiv), fiind incluși bolnavii adulți cu tuberculoză confirmată prin cultură cu pattern de rezistență MDR. În studiu nu au fost incluse cazurile pediatrice cele extrapulmonare și cele rezistente doar la rifampicină, dar cu sensibilitate față de izoniazidă. La fel, ca și în cealaltă cohortă evoluția post-tratament a cazului de boală a fost verificată prin intermediul înregistrărilor în baza de date instituțională pe parcursul a cel puțin un an de la finalizarea tratamentului, dată limită pentru evaluarea postratament a fost considerată 31.12.2017.

Criteriile stabilirii diagnosticului

La toți pacienții din ambele cohorte pattern-ul MDR al rezistenței microbacteriei tuberculoase a fost confirmat în baza culturilor fie pe medii MGIT sau pe medii Lowenstein-Jensen. Schemele de tratament și durata acestora au fost ghidate de protocoalele clinice în vigoare fiind determinate de Comitetele de management al cazurilor de tuberculoză din instituțiile medicale respective [255, 304].

Definițiile de evaluare a rezultatelor tratamentului

Pentru evaluarea rezultatelor tratamentului antituberculos au fost aplicate două seturi de definiții. Primul cel utilizat de către programele naționale de control al tuberculozei din sistemele medicale respective (care sunt în conformitate cu criteriile recomandate de către OMS) și setul de definiții propus de către TBNET, care presupune supraveghere post-tratament timp de un an pentru stabilirea rezultatului final al terapiei (**Tabelul 6.4**).

6.2.2. *Aprecierea postterapeutică a rezultatelor tratamentului la bolnavii cu tuberculoză MDR*

Rezultatele tratamentului în cohorta din Republica Moldova

În perioada 2013-2014 în baza de date SIME-TB au fost identificate 2012 bolnavi care au inițiat tratamentul pentru tuberculoza MDR. Dintre aceștia în studiu au fost incluși 1864 fiind excluse cazurile fără de informație privind statutul sputoculturii la termenul de 6 luni de tratament (n=78), cazurile pediatrice (n=19) și cele extrapulmonare (n=17). Dintre cazurile incluse în analiza finală 2,4% s-au caracterizat prin rezistență adițională la fluorochinolone și aminoglicozidele injectabile. Vârsta medie a bolnavilor incluși în această cohortă a fost de $40 \pm 11,9\%$, majoritatea dintre ei fiind de gen masculin (79,6%). Conform anamnezei de boală tuberculoasă suportată 47,5% dintre bolnavii au fost cazuri noi, 25,1% - cazuri de recidivă, 16,5 - cazuri de retratament după pierderea din supraveghere, 10,4% - retratament după eșec, iar în cazul la 0,53% informațiile despre suportarea tuberculozei în trecut au lipsit.

Compararea rezultatelor tratamentului evaluate prin cele două seturi de definiții au pus în evidență o rată dublă a cazurilor de eșec la aplicarea supravegherii postratament în comparație cu evaluarea la finele tratamentului (evaluarea curentă) (respectiv 23,2% versus 11,7%). Această creștere are loc pe seama la 97 de cazuri care în evaluarea curentă au fost considerate ca vindecate (11,8% dintre toate cazurile calificate ca vindecate în evaluarea curentă) și 107 cazuri considerate inițial ca pierdute din supraveghere (19,5% dintre toate cazurile pierdute din supraveghere în baza evaluării curente).

Tabelul 6.4 Definițiile categoriilor de evaluare a rezultatelor tratamentului după OMS și TBNET

	OMS 2013/2014	OMS 2021	TBNET
Vindecat	Tratamentul a fost finalizat în conformitate cu recomandărilor ghidului național, fără criterii de eșec, și după încheierea fazei intensive au fost obținute 3 culturi consecutive negative, efectuate la o distanță de cel puțin 30 de zile una față de cealaltă.	Bolnav cu tuberculoză pulmonară, cu tuberculoză confirmată microbiologic la inițierea tratamentului, care a finalizat tratamentul conform recomandărilor ghidului național, îndeplinind criteriilor de răspuns bacteriologic în lipsa criteriilor de eșec. ^C	Statut negativ al culturii la termenul de 6 luni de la inițierea tratamentului, lipsă culturilor pozitive după aceasta și lipsa recidivei bolii pe parcursul unui an de la finalizarea tratamentului.
Tratament complet	Tratamentul a fost finalizat în conformitate cu recomandările ghidului național, fără criterii de eșec, dar nu există înregistrări privitor la obținerea după încheierea fazei intensive a obținute 3 culturi consecutive negative, efectuate la o distanță de cel puțin 30 de zile una față de cealaltă. ^A	Pacient care a finalizat tratamentul conform recomandărilor ghidului național, dar care nu întrunește criteriile de vindecare sau eșec al tratamentului.	n/a
Eșec	Tratamentul a fost finalizat sau a apărut necesitatea schimbării definitive a două medicamente din schema de tratament pe motiv de: a) lipsa conversiei la finalizarea fazei intensive; ^B sau b) reversie bacteriologică în faza de continuare după ce a fost atinsă conversia; ^B sau c) demonstrarea achiziționării rezistenței adiționale la fluorochinolone sau injectabilele de linia doi; d) reacții adverse.	Un pacient a cărui regim de tratament necesită a fi terminat sau modificat definitiv cu un regim nou sau strategie de tratament. ^D	Statut pozitiv al culturii la 6 luni de la începutul tratamentului sau după aceasta sau recidiva bolii pe parcursul unui an de la finalizarea tratamentului.
Deces	Pacientul care a decedat din oricare motiv pe parcursul tratamentului	Pacientul care a decedat din oricare cauză până la începerea sau pe parcursul tratamentului	Pacientul care a decedat din oricare motiv pe parcursul perioadei de observație.

Pierdut din supraveghere	Pacient a cărui tratament a fost întrerupt pentru două luni consecutive sau mai mult.	Pacientul care nu a început tratamentul sau a cărui tratament a fost întrerupt pentru două luni consecutive sau mai mult.	Pacientul care nu primește îngrijiri medicale la 6 luni de la inițierea tratamentului.
Neevaluat	Pacientul curia nu ia fost atribuit nici un rezultat al tratamentului (aici sunt incluși bolnavii transferați pentru tratament într-o altă unitate medicală sau a cărui rezultat al tratamentului nu este cunoscut).	Bolnavului căruia nu i-a fost atribuit nici un rezultat al tratamentului. (aici sunt incluși bolnavii transferați pentru tratament într-o altă unitate medicală sau a cărui rezultat al tratamentului nu este cunoscut, dar nu se include cei pierduți din supraveghere).	n/a
Nedeclarat	n/a	n/a	Lipsa informațiilor privitor la statului culturii la 6 luni în perioada administrării tratamentului sau neevaluare după finalizarea tratamentului.

A - în cazul eșecul tratamentului, lipsa conversiei la finele fazei intensive, presupune că pacientul nu a atins conversia la finele duratei maxime a fazei intensive, dacă o astfel de durată nu este definită este sugerat termenul de 8luni, pentru regimurile terapeutice fără o distincție clară între faza intensivă și cea de continuare, la fel, este sugerat termenul de 8 luni de la inițierea tratamentului (pentru a defini rezultatele de vindecat, tratament complet și eșec).

B - Conversia (în cultură negativă) este considerată în cazul în care două culturi consecutive, colectate la un interval de cel puțin 30 de zile, sunt negative. În acest caz data colectării a primei spute este considerată data conversiei. Reversia (în cultură pozitivă) - cultura se consideră repositivată, după conversia inițială, în cazul în care sunt obținute două culturi pozitive colectate la un interval de timp de minimum 30 de zile dintre ele. Pentru definirea eșecului, reversia este luată în considerare, doar când are loc în faza de continuare.

C - răspunsul bacteriologic se referă la conversia bacteriologică fără de reversie; conversia bacteriologică descrie situația în care un bolnav cu tuberculoză confirmată bacteriologic a avut cel puțin două culturi (pentru tuberculoza rezistentă și cea sensibilă) sau microscopii (pentru tuberculoza sensibilă) consecutive negative testate la un interval de timp de cel puțin 7 zile dintre ele; reversia bacteriologică descrie situația în care două culturi (în tuberculoza sensibilă sau tuberculoza rezistentă) sau microscopii (în tuberculoza sensibilă) consecutive, colectate separat la un interval de timp de minim 7 zile între ele, sunt pozitive după obținerea conversiei bacteriologice sau la un pacient cu tuberculoză fără de confirmare bacteriologică.

D - motivele modificării includ: lipsa răspunsului clinic sau bacteriologic; reacții adverse la medicamente; demonstrarea rezistenței față de medicamentele din scheme de tratament.

Recalificarea celor 97 de cazuri din vindecate în eșec a fost efectuată în baza lipsei conversiei sputoculturii la termenul de 6 luni de la debutul terapiei (n=24, 2,9% dintre toate cazuri calificate inițial ca vindecate) sau reversiei la sputocultură pozitivă după 6 luni de tratament (n=73, 8,8% dintre toate cazurile vindecate la evaluarea curentă). Cazurile de pierdere din supraveghere au fost recalificate în eșecuri datorită, statutului pozitiv al sputoculturii la termenul de 6 luni de la inițierea tratamentului (n=64, 18,6% dintre toate cazurile de pierdere din supraveghere conform evaluării curente) sau datorită rezultatului pozitiv al sputoculturii la reevaluarea pe parcursul primului an de la întreruperea tratamentului (n=43, 12,5% dintre toate cazurile pierdute din supraveghere la evaluarea curentă). În cazul ratei de vindecare aceasta a fost similară la aplicarea celor două seturi de criterii de apreciere a rezultatelor tratamentului (43,9% versus 44,2%, **Figura 6.4**).

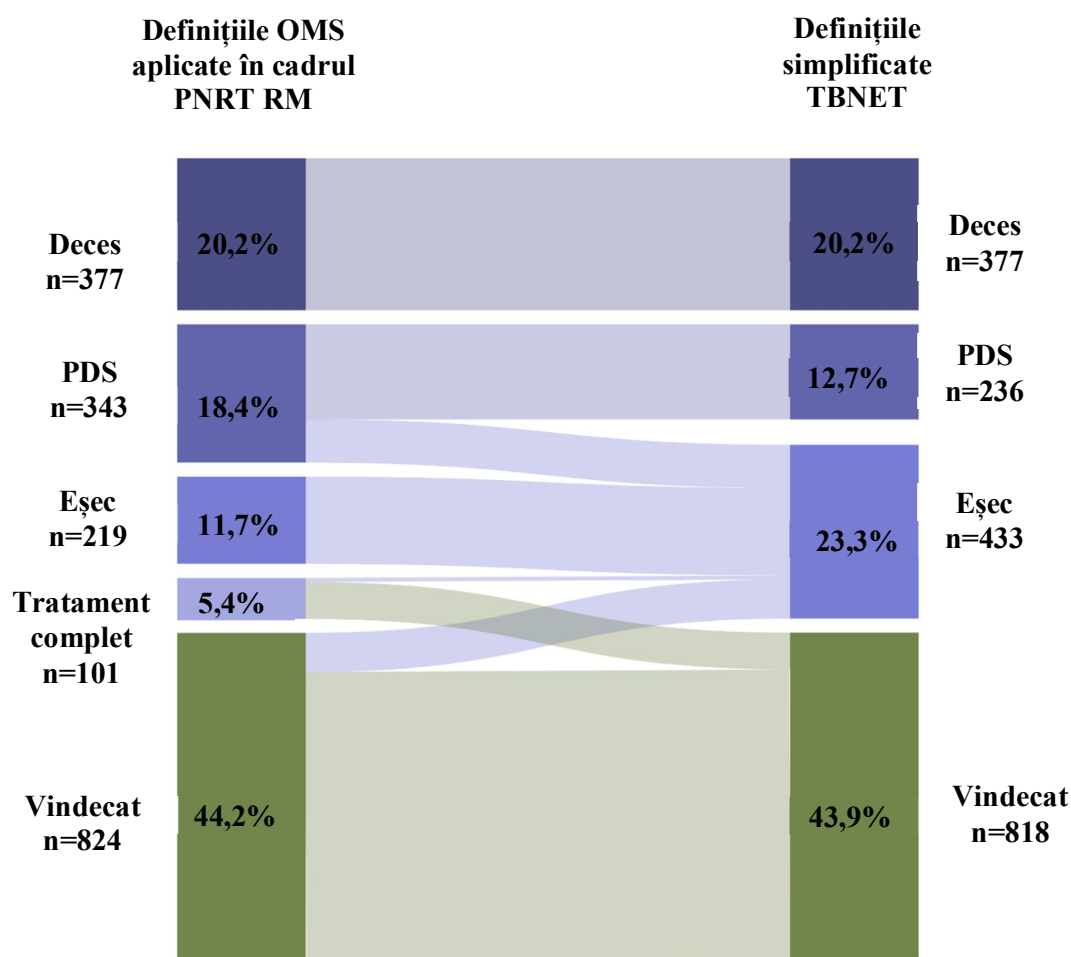


Figura 6.4. Rezultatele tratamentului tuberculozei MDR în cohorta 2013-2014 în Republica Moldova apreciate după definițiile OMS (aplicate în mod curent) și definițiile simplificate TBNET (cu supraveghere post-terapie)

Rezultatele tratamentului în cohorta din Harkiv

Această cohortă a inclus 169 de cazuri de tuberculoză 29 dintre care (17,1%) se caracterizau prin rezistență adițională la fluorochinolone și aminoglicozidele injectabile. Vârsta medie a bolnavilor a constituit $40,9\% \pm 11,8\%$, 71% dintre pacienți fiind de gen masculin. Majoritatea bolnavilor incluși în cohortă ($n=104$, 61,5%) erau cazuri noi de boală.

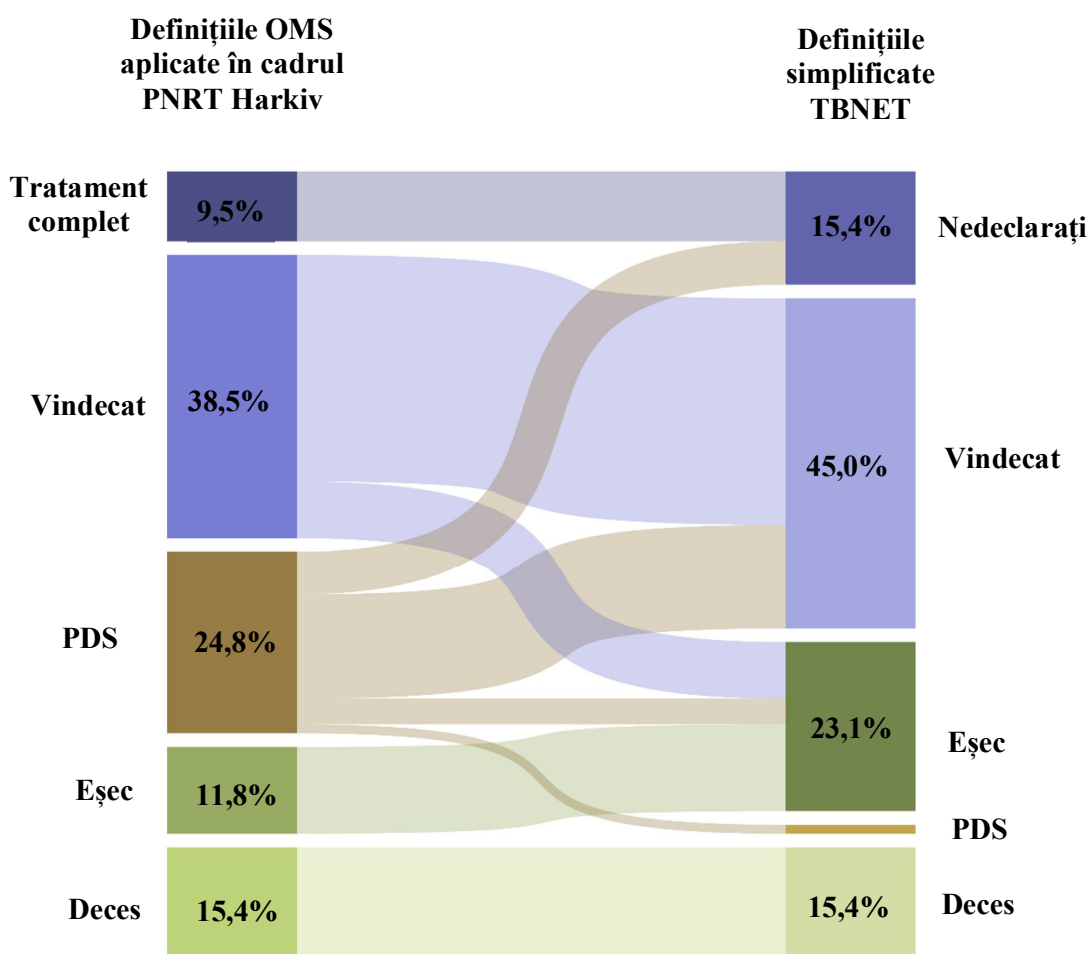


Figura 6.5 Rezultatele tratamentului tuberculozei MDR în cohorta 2014 în Dispensarul antituberculos nr.1 din Harkiv, Ucraina apreciate după definițiile OMS (aplicate în mod curent) și definițiile simplificate TBNET (cu supraveghere post-terapie)

La fel, ca și în cohorta moldovenească, aplicarea criteriilor de supraveghere post-terapie a dus la o redistribuire importantă a pacienților conform rezultatului tratamentului, trendul acestor modificări fiind similar cu cel din cohorta moldovenească (**Figura 6.5**). Astfel, 24/42 (57,1%) dintre pacienții apreciați ca pierduți din supraveghere conform criteriilor curente de evaluare a rezultatului tratamentului au fost calificați ca vindecați la aplicarea criteriile de evaluare

simplificată după TBNET. Dintre bolnavii pierduți din supraveghere 6 au fost recalificați ca eșec, 6 nedeclarați și 2 au rămas în aceeași categorie (pierduți din supraveghere). La fel, toți bolnavii care au fost apreciați ca tratament încheiat conform criteriilor curente de evaluare, nu s-au calificat pentru criteriile de vindecare conform definițiilor simplificate și au fost considerați nedeclarați. În același timp, 17 (26,1%) dintre cei 65 de pacienți calificați vindecați conform criteriilor curente de evaluare au fost considerați ca și eșecuri conform criteriilor simplificate.

6.2.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării postterapeutice a rezultatului tratamentului în tuberculoza MDR

La evaluarea rezultatelor tratamentului tuberculozei MDR în ambele cohorte analizate, prin definițiile simplificate propuse de TBNET, care iau în considerație statutul clinic al bolnavului la un an de la încheierea tratamentului, de rând cu cel microbiologic la termenul de 6 luni de la inițierea terapiei, a fost observată o redistribuire importantă a bolnavilor între categoriile analizate. În special în ambele cohorte analizata a crescut rata cazurilor de eșec (pe contul bolnavilor inițial considerați ca pierduți din supraveghere sau vindecați), în același timp, rata de vindecare a fost comparativ similară la aplicarea ambelor seturi de definiții.

Redistribuirea observată în cohortele analizate este diferită de cea din alte studii în care a fost raportată o rată considerabil mai mare a cazurilor vindecate [200]. Lipsa diferenței între rata de vindicare apreciată prin ambele seturi de definiții în prezenta lucrare poate fi explicată prin practicile de colectare a specimenelor de spută pentru monitorizarea tratamentului antituberculos în cadrul programelor de control al tuberculozei precum cel din Republica Moldova. În special este vorba de o insistență deosebită în asigurarea numărului necesar de specimene examinate la anumite intervale în timp, pentru atingerea criteriilor microbiologice de vindecare, chiar în detrimentul calității specimenului.

Un comentariu separat necesită creșterea ratei eșecurilor tratamentului la aplicarea criteriilor de supraveghere post-terapie pe seama bolnavilor considerați pierduți din supraveghere. Astfel, o treime dintre bolnavii pierduți din supraveghere la revenirea în tratament aveau boală microbiologic activă, prin urmare pe perioada pierderii din câmpul vizual al sistemului medical au constituit o sursă activă de transmitere a tulpinilor micobacteriene cu pattern MDR, factor considerat unul bază în perpetuarea răspândirii endemice a acestor germeni [293].

Unul dintre aspectele discuțiilor privitor la oportunitatea evaluării post-terapie este dat de scopul per se al evaluării, și anume pentru aprecierea eficacității clinice a tratamentului, sau pentru determinarea performanței programelor de control al tuberculozei. Definițiile recomandate de către OMS urmăresc determinarea performanței programelor de control al tuberculozei și nu tot

timpul corespund logicii clinice. De exemplu definiția de eșec al tratamentului recomandată de OMS consideră mai multe determinante microbiologice de rând cu anularea unuia sau mai multor medicamente în caz de identificare a rezistenței sau de apariție a reacțiilor adverse. Astfel, în cazul înlocuirii în schema de tratament a mai mult de 2 medicamente (datorită rezistenței sau a reacțiilor adverse) cazul de boală este calificat ca eșec și este reintrodus în registrele programului de control al tuberculozei. Cu alte cuvinte neeficiența schemei de tratament este considerată ca rezultat final al terapiei [184].

Evaluarea rezultatelor tratamentului post-terapie frecvent este văzută drept una mai puțin fezabilă datorită următoarelor considerente: 1) diferențierea recidivei bolii de reinfecție poate fi făcută doar prin aplicarea metodelor de secvențiere a genomului micobacterian (accesul la care în activitatea clinică curentă este extrem de limitat); 2) supravegherea post-tratament ar necesita resurse importante, care de regulă sunt apreciate ca fiind indisponibile în multe dintre zonele cu incidență înaltă a tuberculozei; 3) raportarea după o perioadă de supraveghere ar putea în unele cazuri întârzia luarea unor decizii prompte în cazurile de eșec [303].

Contestând argumentele de mai sus în defavoarea evaluării post-terapie, în cazul celui dintâi, ar fi de menționat că deși datele privitor la rata recidivei sau reinfectării în perioada post-terapeutică precoce sunt limitate, cele disponibile sugerează că totuși recăderile bolii în primul an post-tratament au loc prioritar datorită recidivării infecției tuberculoase și nu secundar reinfectării [307]. În plus, la ora actuală asistăm la o extindere rapidă a utilizării tehnicilor de secvențiere inclusiv pentru diagnosticul curent din țările cu incidență înaltă a tuberculozei, fapt care ne face optimiști privitor la posibilitatea diferențierii moleculare în practica clinică curentă a cazurilor de recidivă de cele de reinfectare deja în viitorul apropiat [308].

În ceea ce privește fezabilitatea supravegherii post-terapeutice, trebuie menționat faptul că monitorizarea post-terapie este o realitate în multe dintre programele naționale de control al tuberculozei, în literatură fiind raportate mai multe modalități a unei astfel de supravegheri. Astfel, putem aminti contactarea directă a bolnavului care a încheiat tratamentul, realizată fie prin vizita la domiciliul pacientului fin prin apel telefonic. Succesul supravegherii în cazul acestei tactici poate depăși rata de 90% [200, 309]. La fel, informațiile obținute prin contactarea directă a bolnavilor ar putea fi complementate cu cele obținute de la membrii comunității, în special considerând faptul că în multe regiuni cu incidență înaltă a tuberculozei, membrii comunității sunt implicați activ în oferirea tratamentului antituberculos [310]. În cazul imposibilității contactării directe sau indirecte a bolnavilor evaluarea post-terapeutică ar putea fi efectuată prin intermediul registrelor naționale sau regionale, fezabilitatea acestei abordări fiind demonstrată și în prezentul studiu.

În contextul celui de al treilea argument frecvent anunțat în potrive evaluării post-terapie (întârzierea detectării cazurilor de eșec), trebuie menționat faptul că majoritatea cazurilor de eșec de regulă sunt identificate în baza criteriilor microbiologice în primele 6 luni de terapie, iar identificarea promptă a unui număr relativ redus de cazuri de reactivare post-tratament ține în mare parte de vigilența generală a sistemului medical față de diagnosticul și profilaxia bolilor infecțioase cu transmitere aerogenă.

Tot în susținerea raționalității supravegherii post-terapeutice pentru aprecierea rezultatelor finale ale tratamentului menționăm că atât în studiile clinice de acum câteva decenii cât și trialurile contemporane care evaluează medicamentele și schemele antituberculoase a fost aplicat și se aplică ca și criteriu de eficacitate inclusiv prevenirea recăderii bolii [13]. Astfel, pare lipsit de sens renunțarea la acest criteriu de eficacitate, la aprecierea rezultatului terapiei în cazul pacientului individual în practica clinică curentă.

În ultima revizuire a definițiilor de apreciere a rezultatelor tratamentului antituberculos publicată de către OMS (**Tabelul 6.4**) [277], a fost introdusă recomandarea opțională de stabilire a rezultatelor finale ale tratamentului antituberculos după o supraveghere post-terapeutică de 6 luni în studiile operaționale, dar nu și în evaluarea programatică a rezultatelor tratamentului. Această abordarea diferențiată într-un fel oficializează înțelegerea unanimă a faptului că evaluarea programatică ar putea să nu releve adevărată eficiență clinică a terapiei antituberculoase și într-un sens întredeschide fereastra discuțiilor despre existența unor criterii potențial diferite pentru evaluarea eficacității terapiei în practica clinică (diferite de cele de evaluare programatică sau din cercetare).

6.3 Concluzii la capitolul 6

1. Trei pătrimi dintre bolnavii adulți cu tuberculoză pulmonară la momentul diagnosticului bolii au afectată funcția pulmonară, la majoritatea dintre ei fiind prezentă o disfuncție de tip restrictiv.

2. Pacienții adulți cu tuberculoză pulmonară cu pattern restrictiv de afectare a funcției pulmonare determinat la momentul stabilirii diagnosticului au o rată mai mică a tratamentului de succes și o rată mai mare a rezultatelor negative ale terapiei (eșec sau deces) comparativ cu pacienții cu funcție pulmonară normală, acestea corelând cu severitatea restricției.

3. Disfuncția pulmonară de tip restrictiv prezentă la momentul diagnosticului bolii la bolnavii adulți cu tuberculoză pulmonară este un factor de risc independent asociat cu rezultatele negative (eșec sau deces) ale tratamentului antituberculos.

4. Supravegherea postterapeutică, inclusiv în condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză multidrogrezistentă, permite o evaluare mai obiectivă, din punct de vedere clinic, a rezultatelor tratamentului antituberculos în special a eșecurilor terapiei.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

CONCLUZII

1. Nivelul limfocitelor T cu profil citokinic IL-2⁻IFN- γ ⁺ este crescut la bolnavii cu tuberculoză activă comparativ cu persoanele cu ITBL sau cele cu tuberculoză vindecată și acesta poate fi ușor determinat prin FluoroSpot, deși aplicarea în practica clinică a acestui biomarker nu oferă acuratețea necesară.

2. Citirea automatizată a frotiurilor microscopice în colorație fluorescentă cu auramină cu ajutorul dispozitivului Fluorobot posedă sensibilitate și specificitate comparabile cu cele obținute la citirea manuală de către un microscopic experimentat și poate fi cu succes aplicată pentru optimizarea lucrului personalului de laborator, în special în laboratoarele specializate cu volum mare a probelor analizate.

3. Implementarea Xpert MTB/Rif la nivel național în Republica Moldova a contribuit la reducerea semnificativă a întârzierii terapeutice la bolnavii adulți cu tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă, aceasta devenind de 6 ori mai mică comparativ cu perioada de până la implementare.

4. Utilizarea specimenelor de aspirat bronșic la bolnavii cu tuberculoză pulmonară cu spută paucibacilară (BAAR și Xpert MTB/Rif negativă) permite adițional confirmarea microbiologică a diagnosticului la o pătrime dintre acești bolnavi.

5. Includerea badaquilinei în schemele de tratament administrate în condițiile managementului programatic al bolnavilor cu tuberculoză MDR, inclusiv la cei cu eșec al tratamentului precedent, se asociază cu o rată mai mare și mai rapidă de conversie a sputei, o rată mai înaltă a tratamentului de succes și mortalitate mai redusă.

6. Rezistența la izoniazidă la tulpinile multidrog rezistente de *M. tuberculosis* circulante în Republica Moldova este determinată de mutații în gena katG, izolat sau în combinație cu mutații în promotorul inhA, asociate cu un nivel înalt de rezistență față de acest medicament, fapt care periclitează administrarea empirică a izoniazidei în doze mari ca parte a schemelor de tratament în tuberculoza multidrogrezistentă.

7. Disfuncția pulmonară de tip restrictiv stabilită la momentul diagnosticului bolii la pacienții adulți cu tuberculoză pulmonară este un factor de risc independent asociat cu rezultatele negative (eșec sau deces) ale tratamentului antituberculos, cu un impact comparabil cu cel al rezistenței multiple la medicamente.

8. Supravegherea postterapeutică, inclusiv în condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză multidrogrezistentă, permite o evaluare mai obiectivă din punct de vedere clinic a rezultatelor tratamentului antituberculos.

RECOMANDĂRI

1. Aprecierea limfocitelor T în sângele periferic secretoare de IL-2-INF- γ^+ nu este recomandată pentru utilizarea în practica clinică pentru diagnosticul tuberculozei active sau diferențierea infecției tuberculoase latente de tuberculoza activă.

2. Pentru examinarea microscopică a frotiurilor de spută, colectate în scop diagnostic de la persoanele suspecte de tuberculoză pulmonară, în laboratoarele cu volum sporit de probe examinate (laboratoarele de referință regionale sau cel național) este recomandată utilizarea citirii automatizate a acestor frotiuri prin intermediul dispozitivelor robotizate de tip Fluorobot.

3. La bolnavii suspecți de tuberculoză pulmonară cu spută paucibacilară (BAAR și Xpert negativă) pentru confirmarea microbiologică a tuberculozei pulmonare este recomandată examinarea microbiologică prin (Xpert MTB/Rif și cultură) a probelor de aspirat bronșic.

4. Pentru asigurarea inițierii în timp util a tratamentului antituberculos la bolnavii cu tuberculoză multidrogrezistentă, se recomandă asigurarea durabilă cu consumabile pentru testările moleculare-genetice de diagnosticare rapidă a tuberculozei rezistente la rifampicină și celei multidrogrezistente.

5. Includerea în schemele individualizate de tratament a tuberculozei multidrog rezistente a badaquilinei, de rând cu asigurarea aderenței la tratament a bolnavilor respectivi este recomandată la toți bolnavii fără rezistență demonstrată față de aceste medicament.

6. Testarea, prealabil includerii în schemele de tratament a izoniazidei în doze mari, a mutațiilor genotipice asociate rezistenței față de acest medicament este recomandată la toți bolnavii cu tuberculoză multidrogrezistentă care potențial urmează să primească izoniazida în doze terapeutice crescute.

7. Aprecierea funcției pulmonare prin spirometrie la bolnavii cu tuberculoză pulmonară, cu respectarea măsurilor de control al infecției, este recomandată în scopul identificării pacienților cu risc sporit rezultat nefavorabil al tratamentului, care potențial ar putea beneficia de intervenții de reabilitare respiratorie.

8. Monitorizarea postterapeutică pentru stabilirea rezultatelor finale ale tratamentului este recomandată la bolnavii cu tuberculoză tratați în cadrul programului național de răspuns la tuberculoză.

BIBLIOGRAFIE

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. În *Glob Tuberc Rep*, <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021> (2021, accessed 1 March 2022).
2. Uplekar M. et al. WHO's new End TB Strategy. În *Lancet* 2015, nr. 385, pp. 1799–1801. ISSN01406736.
3. Lange C. et al. Management of drug-resistant tuberculosis. În *Lancet* 2019, nr. 394, pp. 953–966.
4. Qin Z.Z. et al. How is Xpert MTB/RIF being implemented in 22 high tuberculosis burden countries? În *Eur Respir J* 2015, nr. 45, pp. 549–54. ISSN1399-3003.
5. Lisboa M. et al. Time delay and associated mortality from negative smear to positive Xpert MTB/RIF test among TB/HIV patients: A retrospective study 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. În *BMC Infect Dis* 2019, nr. 19, pp. 18. ISSN14712334.
6. Catanzaro A. et al. Performance Comparison of Three Rapid Tests for the Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis. În *PLoS One* 2015, nr. 10, pp. e0136861. ISSN1932-6203.
7. Law Y.N. et al. Low cost automated whole smear microscopy screening system for detection of acid fast bacilli. În *PLoS One* 2018, nr. 13, pp. e0190988. ISSN1932-6203.
8. Sudbury E.L. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific cytokine biomarkers to differentiate active TB and LTBI: A systematic review. În *J Infect* 2020, nr. 81, pp. 873–881. ISSN1532-2742.
9. Lange C. et al. Perspective for Precision Medicine for Tuberculosis. În *Front Immunol*, nr. 11. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.566608. ISSN16643224.
10. Millington K.A. et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. În *J Immunol* 2007, nr. 178, pp. 5217–5226. ISSN0022-1767.
11. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4, Treatment : drug-resistant tuberculosis treatment. pp. 98.
12. Ahmad N. et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. În *Lancet* 2018, nr. 392, pp. 821–834. ISSN1474547X.
13. Günther G. et al. Defining Outcomes of Tuberculosis (Treatment): From the Past to the Future. În *Respiration* 2021, nr. 100, pp. 843–852. ISSN0025-7931.

14. Lange C. et al. Time to revise WHO-recommended definitions of MDR-TB treatment outcomes. În *Lancet Respir Med* 2018, nr. 6, pp. 246–248. ISSN2213-2619.
15. Oancea C. et al. Tratat de pneumologie pentru medicii rezidenți, www.umft.ro/editura (2021).
16. Who revised definitions and reporting framework for tuberculosis. 2013. ISSN15607917.
17. Sharma S.K., Mohan A. Miliary Tuberculosis. În *Microbiol Spectr*, nr. 5. Epub ahead of print 10 March 2017. DOI: 10.1128/MICROBIOLSPEC.TNMI7-0013-2016. ISSN2165-0497.
18. Mert A., Ozaras R. A terminological controversy: Do disseminated and miliary tuberculosis mean the same? În *Respiration* 2005, nr. 72, pp. 113. ISSN00257931.
19. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis> (2020).
20. World Health Organization. Division of Communicable Diseases, Surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world / the WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Report 2, Prevalence and trends. În *Geneva*, <http://www.who.int/iris/handle/10665/66493> (2000).
21. WHO. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, <http://apps.who.int/bookorders>. (2022, accessed 25 December 2019).
22. Tiemersma E.W. et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. În *PLoS One*, nr. 6. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0017601. ISSN19326203.
23. Lange C. et al. Management of drug-resistant tuberculosis. În *Lancet*, nr. 394. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31882-3. ISSN1474547X.
24. Vesga J.F. et al. Assessing tuberculosis control priorities in high-burden settings: a modelling approach. În *Lancet Glob Heal* 2019, nr. 7, pp. e585–e595. ISSN2214-109X.
25. Yang C. et al. Phylogeography and transmission of *M. tuberculosis* in Moldova: A prospective genomic analysis. În *PLoS Med*, nr. 19. Epub ahead of print 1 February 2022. DOI: 10.1371/JOURNAL.PMED.1003933. ISSN1549-1676.
26. Carranza C. et al. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. În *Front Immunol*, nr. 11. Epub ahead of print 10 September 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.02006. ISSN1664-3224.

27. World Health Organization (WHO). Operational handbook on tuberculosis. În *Modul 3 Diagnosis Rapid diagnostics Tuberc diagnosis* 2020, pp. 56.
28. Getahun H. et al. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection . În *N Engl J Med* 2015, nr. 372, pp. 2127–2135. ISSN0028-4793.
29. Guidelines on the Management of Latent Tuberculosis Infection. În *Guidel Manag Latent Tuberc Infect*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK293818/> (2015, accessed 14 April 2022).
30. Organizat W.H. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 1: Prevention. Tuberculosis preventive treatment. 2021. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.30978/tb2021-2-86. ISSN2220-5071.
31. Yang H., Kruh-Garcia N.A., Dobos K.M. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. În *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, nr. 66, pp. 273–280. ISSN1574-695X.
32. Farhat M. et al. False-positive tuberculin skin tests: What is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? În *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, nr. 10, pp. 1192–1204. ISSN10273719.
33. Tuberculoza la copil Protocol clinic național. 2020.
34. Diel R. et al. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting Mycobacterium tuberculosis infection with a blood test. În *Eur Respir J* 2006, nr. 28, pp. 16–23. ISSN0903-1936.
35. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. În *Am J Respir Crit Care Med* 1999, nr. 159, pp. 15–21. ISSN1073-449X.
36. Chitnis A.S. et al. Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. În *Am J Gastroenterol* 2021, nr. 116, pp. 2155–2158. ISSN15720241.
37. Gong W., Wu X. Differential Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Active Tuberculosis: A Key to a Successful Tuberculosis Control Strategy. În *Front Microbiol*, nr. 12. Epub ahead of print 22 October 2021. DOI: 10.3389/FMICB.2021.745592. ISSN1664-302X.
38. Arend S.M. et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. În *Infect Immun* 2000, nr. 68, pp. 3314–3321. ISSN0019-9567.
39. Goletti D., Sanduzzi A., Delogu G. Performance of the tuberculin skin test and interferon- γ release assays: an update on the accuracy, cutoff stratification, and new potential immune-

- based approaches. În *J Rheumatol Suppl* 2014, nr. 91, pp. 24–31. ISSN0380-0903.
40. Goletti D. et al. The role of IGRA in the diagnosis of tuberculosis infection, differentiating from active tuberculosis, and decision making for initiating treatment or preventive therapy of tuberculosis infection. În *Int J Infect Dis*. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1016/J.IJID.2022.02.047. ISSN1878-3511.
 41. World Health Organization. Use of alternative interferon- gamma release assays for the diagnosis of TB infection: WHO Policy Statement, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240042346> (2022).
 42. Xu Y. et al. Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold-Plus in the Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infections in Immunocompromised Patients: a Real-World Study. În *Microbiol Spectr*. Epub ahead of print 2 March 2022. DOI: 10.1128/SPECTRUM.01870-21. ISSN2165-0497.
 43. Lalvani A. et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. În *Am J Respir Crit Care Med* 2001, nr. 163, pp. 824–828. ISSN1073-449X.
 44. Diel R. et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. În *Eur Respir J* 2011, nr. 37, pp. 88–99. ISSN1399-3003.
 45. Bua A. et al. Effect of teriflunomide on QuantiFERON-TB Gold results. În *Med Microbiol Immunol* 2017, nr. 206, pp. 73–75. ISSN1432-1831.
 46. Latorre I. et al. Immune-mediated inflammatory diseases differently affect IGRAs' accuracy for latent tuberculosis infection diagnosis in clinical practice. În *PLoS One*, nr. 12. Epub ahead of print 1 December 2017. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0189202. ISSN1932-6203.
 47. Hakimian S. et al. The conundrum of indeterminate QuantiFERON-TB Gold results before anti-tumor necrosis factor initiation. În *Biologics* 2018, nr. 12, pp. 61–67. ISSN1177-5475.
 48. World Health Organization. Rapid communication : TB antigen-based skin tests for the diagnosis of TB infection. 2022.
 49. Sester M. et al. Numbers needed to treat to prevent tuberculosis. În *Eur Respir J* 2015, nr. 46, pp. 1836–1838. ISSN13993003.
 50. Qiu B. et al. Evaluation of cytokines as a biomarker to distinguish active tuberculosis from latent tuberculosis infection: a diagnostic meta-analysis. În *BMJ Open*, nr. 10. Epub ahead of print 7 October 2020. DOI: 10.1136/BMJOPEN-2020-039501. ISSN2044-6055.
 51. Steingart K.R. et al. Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary

- and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *În PLOS Med* 2011, nr. 8, pp. e1001062. ISSN1549-1676.
52. World Health Organization. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. *În Geneva WHO* 2011, pp. 19.
 53. Latorre I. et al. Study of CD27 and CCR4 Markers on Specific CD4 + T-Cells as Immune Tools for Active and Latent Tuberculosis Management. *În Front Immunol*, nr. 9. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.03094. ISSN1664-3224.
 54. Halliday A. et al. Stratification of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection by Cellular Immune Profiling. *În J Infect Dis* 2017, nr. 215, pp. 1480–1487. ISSN1537-6613.
 55. Acharya M.P. et al. CD38+CD27-TNF- α + on Mtb-specific CD4+ T Cells Is a Robust Biomarker for Tuberculosis Diagnosis. *În Clin Infect Dis* 2021, nr. 73, pp. 793–801. ISSN1537-6591.
 56. Ruibal P. et al. The role of donor-unrestricted T-cells, innate lymphoid cells, and NK cells in anti-mycobacterial immunity. *În Immunol Rev* 2021, nr. 301, pp. 30–47. ISSN1600-065X.
 57. Paquin-Proulx D. et al. Latent Mycobacterium tuberculosis infection is associated with a higher frequency of mucosal-associated invariant T and invariant natural killer T cells. *În Front Immunol* 2018, nr. 9, pp. 1394. ISSN16643224.
 58. Shi C. lin et al. Upregulation of PD-1 expression on circulating CD8+ but not CD4+ T cells is associated with tuberculosis infection in health care workers. *În BMC Immunol*, nr. 22. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1186/S12865-021-00433-9. ISSN1471-2172.
 59. Warsinske H., Vashisht R., Khatri P. Host-response-based gene signatures for tuberculosis diagnosis: A systematic comparison of 16 signatures. *În PLoS Med*, nr. 16. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1371/JOURNAL.PMED.1002786. ISSN1549-1676.
 60. Mistry R. et al. Gene-expression patterns in whole blood identify subjects at risk for recurrent tuberculosis. *În J Infect Dis* 2007, nr. 195, pp. 357–365. ISSN0022-1899.
 61. Jacobsen M. et al. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by Mycobacterium tuberculosis. *În J Mol Med (Berl)* 2007, nr. 85, pp. 613–621. ISSN0946-2716.
 62. Lv L. et al. RNA Profiling Analysis of the Serum Exosomes Derived from Patients with Active and Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *În Front Microbiol*, nr. 8. Epub ahead of print 12 June 2017. DOI: 10.3389/FMICB.2017.01051. ISSN1664-302X.
 63. Heyckendorf J., Gillespie S.H., Ruhwald M. Culture-free proof of Mycobacterium

- tuberculosis - a new assay for viable bacteria. În *EBioMedicine*, nr. 62. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2020.103117. ISSN2352-3964.
64. Hoang L.T. et al. Transcriptomic signatures for diagnosing tuberculosis in clinical practice: a prospective, multicentre cohort study. În *Lancet Infect Dis* 2021, nr. 21, pp. 366–375. ISSN1474-4457.
 65. Heyckendorf J. et al. Pathogen-free diagnosis of tuberculosis. În *Lancet Infect Dis* 2021, nr. 21, pp. 1066. ISSN14744457.
 66. Scriba T.J. et al. Biomarker-guided tuberculosis preventive therapy (CORTIS): a randomised controlled trial. În *Lancet Infect Dis* 2021, nr. 21, pp. 354–365. ISSN14744457.
 67. Mendelsohn S.C. et al. Validation of a host blood transcriptomic biomarker for pulmonary tuberculosis in people living with HIV: a prospective diagnostic and prognostic accuracy study. În *Lancet Glob Heal* 2021, nr. 9, pp. e841–e853. ISSN2214109X.
 68. Scriba T.J. et al. Biomarker-guided tuberculosis preventive therapy (CORTIS): a randomised controlled trial. În *Lancet Infect Dis* 2021, nr. 21, pp. 354–365. ISSN1474-4457.
 69. Mateos J. et al. High-resolution quantitative proteomics applied to the study of the specific protein signature in the sputum and saliva of active tuberculosis patients and their infected and uninfected contacts. În *J Proteomics* 2019, nr. 195, pp. 41–52. ISSN1876-7737.
 70. Sun H. et al. Label-Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Plasma Biomarkers for Distinguishing Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. În *Front Microbiol*, nr. 9. Epub ahead of print 13 June 2018. DOI: 10.3389/FMICB.2018.01267. ISSN1664-302X.
 71. Weiner J. et al. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. În *PLoS One*, nr. 7. Epub ahead of print 23 July 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0040221. ISSN1932-6203.
 72. Dutta N.K. et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals novel biomarkers in the blood for tuberculosis diagnosis in children. În *Sci Rep*, nr. 10. Epub ahead of print 1 December 2020. DOI: 10.1038/S41598-020-75513-8. ISSN2045-2322.
 73. Belay M. et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in CD34-positive peripheral blood mononuclear cells of asymptomatic tuberculosis contacts: an observational study. În *The Lancet Microbe* 2021, nr. 2, pp. e267–e275. ISSN2666-5247.
 74. Verma R. et al. A Novel, High-sensitivity, Bacteriophage-based Assay Identifies Low-level Mycobacterium tuberculosis Bacteremia in Immunocompetent Patients With Active and Incipient Tuberculosis. În *Clin Infect Dis* 2020, nr. 70, pp. 933–936. ISSN1537-6591.

75. Tang J. et al. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin (HBHA)-induced interferon- γ release assay (IGRA) for discrimination of latent and active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *În PLoS One*, nr. 16. Epub ahead of print 1 July 2021. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0254571. ISSN1932-6203.
76. Chegou N.N. et al. Potential of novel Mycobacterium tuberculosis infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. *În BMC Infect Dis*, nr. 12. Epub ahead of print 20 January 2012. DOI: 10.1186/1471-2334-12-10. ISSN1471-2334.
77. Meier N.R. et al. A Systematic Review on Novel Mycobacterium tuberculosis Antigens and Their Discriminatory Potential for the Diagnosis of Latent and Active Tuberculosis. *În Front Immunol*, nr. 9. Epub ahead of print 9 November 2018. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.02476. ISSN1664-3224.
78. Li Z. et al. Microarray-based selection of a serum biomarker panel that can discriminate between latent and active pulmonary TB. *În Sci Rep*, nr. 11. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/S41598-021-93893-3. ISSN2045-2322.
79. CAO S.H. et al. Screening of Serum Biomarkers for Distinguishing between Latent and Active Tuberculosis Using Proteome Microarray. *În Biomed Environ Sci* 2018, nr. 31, pp. 515–526. ISSN0895-3988.
80. Essential Tuberculosis. Springer International Publishing, 2021. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-66703-0.
81. World Health Organization (WHO). Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 3 : Diagnosis -Rapid diagnostics for tuberculosis detection. 2021.
82. Stinson K.W. et al. Mycobacteriology Laboratory Manual. 2014.
83. Singhal R., Myneedu V.P. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *În Int J mycobacteriology* 2015, nr. 4, pp. 1–6. ISSN2212-554X.
84. Chang E.W., Page A.L., Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *În Eur Respir J* 2016, nr. 47, pp. 929–937. ISSN0903-1936.
85. Chaidir L. et al. Implementation of LED Fluorescence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary and HIV-Associated Tuberculosis in a Hospital Setting in Indonesia. *În PLoS One*, nr. 8. Epub ahead of print 19 April 2013. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0061727. ISSN19326203.
86. Datta S. et al. Clinical evaluation of tuberculosis viability microscopy for assessing treatment response. *În Clin Infect Dis* 2015, nr. 60, pp. 1186–1195. ISSN1537-6591.

87. Uddin M.K.M. et al. Comparison of direct versus concentrated smear microscopy in detection of pulmonary tuberculosis. În *BMC Res Notes* 2013, nr. 6, pp. 1–6. ISSN17560500.
88. Chesov D. et al. Automated high-throughput digital fluorescence microscopy for TB diagnosis. În *Int J Tuberc Lung Dis*, nr. 24. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.5588/ijtld.19.0811. ISSN18157920.
89. Marais B.J. et al. The bacteriologic yield in children with intrathoracic tuberculosis. În *Clin Infect Dis*, nr. 42. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1086/502652. ISSN1537-6591.
90. BACTEC™ MGIT™ 960 System, <http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-mgt960-7ml.pdf> (accessed 2 January 2019).
91. Asmar S., Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. În *Front Microbiol* 2015, nr. 6, pp. 1184. ISSN1664302X.
92. Helb D. et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. În *J Clin Microbiol* 2010, nr. 48, pp. 229–237. ISSN1098-660X.
93. Steingart K.R. et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. În *Cochrane database Syst Rev*, nr. 2014. Epub ahead of print 21 January 2014. DOI: 10.1002/14651858.CD009593.PUB3. ISSN1469-493X.
94. Kay A.W. et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra assays for active tuberculosis and rifampicin resistance in children. În *Cochrane database Syst Rev*, nr. 8. Epub ahead of print 27 August 2020. DOI: 10.1002/14651858.CD013359.PUB2. ISSN1469-493X.
95. Kohli M. et al. Xpert ® MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance. În *Cochrane database Syst Rev*, nr. 8. Epub ahead of print 27 August 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD012768.PUB2. ISSN1469-493X.
96. Albert H. et al. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for tuberculosis: what lessons have we learnt and how can we do better? În *Eur Respir J* 2016, nr. 48, pp. 516–525. ISSN1399-3003.
97. Georgiou S.B. et al. Equivalence of the GeneXpert System and GeneXpert Omni System for tuberculosis and rifampicin resistance detection. În *PLoS One*, nr. 16. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0261442. ISSN1932-6203.
98. Creswell J. et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries. În *BMC Infect Dis* 2014, nr. 14, pp. 2. ISSN14712334.
99. Chesov D. et al. Reduction in treatment delay of MDR-TB cases as a result of Xpert

- MTB/RIF implementation in Moldova. În *INT J TUBERC LUNG DIS* 2016, nr. 20, pp. S521.
100. Dorman S.E. et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. În *Lancet Infect Dis* 2018, nr. 18, pp. 76. ISSN14744457.
 101. Bahr N.C. et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study. În *Lancet Infect Dis* 2018, nr. 18, pp. 68–75. ISSN14733099.
 102. Ferrarotti I., Ottaviani S. Laboratory diagnosis. În *ERS Monogr* 2019, nr. 2019, pp. 39–51. ISSN23125098.
 103. Organization W.H. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva PP - Geneva: World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254792>.
 104. Nikam C. et al. Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* with Truenat MTB: A Near-Care Approach. În *PLoS One* 2013, nr. 8, pp. e51121. ISSN1932-6203.
 105. Penn-Nicholson A. et al. A prospective multicentre diagnostic accuracy study for the Truenat tuberculosis assays. În *Eur Respir J*, nr. 58. Epub ahead of print 1 November 2021. DOI: 10.1183/13993003.00526-2021. ISSN1399-3003.
 106. Sharma K. et al. Comparative analysis of Truenat™ MTB Plus and Xpert® Ultra in diagnosing tuberculous meningitis. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2021, nr. 25, pp. 626–631. ISSN1815-7920.
 107. Shete P.B. et al. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. În *BMC Infect Dis* 2019, nr. 19, pp. 1–11. ISSN14712334.
 108. MacLean E. et al. Advances in Molecular Diagnosis of Tuberculosis. În *J Clin Microbiol*, nr. 58. Epub ahead of print 1 October 2020. DOI: 10.1128/JCM.01582-19. ISSN1098660X.
 109. World Health Organization. WHO evaluation of centralized assays for detection of TB and of resistance to rifampicin and isoniazid. În *Who*, http://www9.who.int/tb/features_archive/centralized-assays-detection-tb/en/ (2019).
 110. Bjerrum S. et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in people living with HIV. În *Cochrane Database Syst Rev*, nr. 2019. Epub ahead of print 21 October 2019. DOI: 10.1002/14651858.CD011420.PUB3. ISSN1469493X.
 111. Li Z. et al. The Value of FujiLAM in the Diagnosis of Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. În *Front public Heal*, nr. 9. Epub ahead of print 25 November 2021.

DOI: 10.3389/FPUBH.2021.757133. ISSN2296-2565.

112. World Health Organization (WHO). Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. În *Who* 2018, pp. 1–106.
113. Kim S.J. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. În *Eur Respir J* 2005, nr. 25, pp. 564–569. ISSN0903-1936.
114. Minassian A.M. et al. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: Easy and fast. În *BMC Infect Dis* 2014, nr. 14, pp. 1–7. ISSN14712334.
115. Lee J. et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second-line drugs. În *Antimicrob Agents Chemother* 2014, nr. 58, pp. 11–18. ISSN1098-6596.
116. World Health Organization. Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis. În *Policy statement*.
117. Zifodya J.S. et al. Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. În *Cochrane database Syst Rev*, nr. 2. Epub ahead of print 22 February 2021. DOI: 10.1002/14651858.CD009593.PUB5. ISSN1469-493X.
118. Zetola N.M. et al. Mixed Mycobacterium tuberculosis complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. În *J Clin Microbiol* 2014, nr. 52, pp. 2422–2429. ISSN1098-660X.
119. Köser C.U. et al. Genetic diversity within Mycobacterium tuberculosis complex impacts on the accuracy of genotypic pyrazinamide drug-susceptibility assay. În *Tuberculosis (Edinb)* 2014, nr. 94, pp. 451–453. ISSN1873-281X.
120. Chakravorty S. et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. În *MBio* 2017, nr. 8, pp. e00812-17. ISSN2150-7511.
121. Cao Y. et al. Xpert MTB/XDR: a 10-Color Reflex Assay Suitable for Point-of-Care Settings To Detect Isoniazid, Fluoroquinolone, and Second-Line-Injectable-Drug Resistance Directly from Mycobacterium tuberculosis-Positive Sputum. În *J Clin Microbiol*, nr. 59. Epub ahead of print 1 March 2021. DOI: 10.1128/JCM.02314-20. ISSN1098660X.
122. Albert H. et al. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for tuberculosis: what lessons have we learnt and how can we do better? În *Eur Respir J* 2016, nr. 48, pp. 516–25.

ISSN1399-3003.

123. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. In *World Heal Organ* 2021, pp. 1–164.
124. Nathavitharana R.R. et al. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. In *Eur Respir J* 2017, nr. 49, pp. 1601075. ISSN13993003.
125. Driesen M. et al. Evaluation of a novel line probe assay to detect resistance to pyrazinamide, a key drug used for tuberculosis treatment. In *Clin Microbiol Infect* 2018, nr. 24, pp. 60. ISSN14690691.
126. Dippenaar A. et al. Diagnostic accuracy of the FluoroType MTB and MTBDR VER 2.0 assays for the centralized high-throughput detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA and isoniazid and rifampicin resistance. In *Clin Microbiol Infect* 2021, nr. 27, pp. 1351.e1-1351.e4. ISSN14690691.
127. Beutler M. et al. A pre-clinical validation plan to evaluate analytical sensitivities of molecular diagnostics such as BD MAX MDR-TB, Xpert MTB/Rif Ultra and FluoroType MTB. In *PLoS One*, nr. 15. Epub ahead of print 1 January 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0227215. ISSN19326203.
128. Satta G., Atzeni A., McHugh T.D. Mycobacterium tuberculosis and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. In *Clin Microbiol Infect* 2017, nr. 23, pp. 69–72. ISSN1469-0691.
129. Schmeing S., Robinson M.D. ReSeq simulates realistic Illumina high-throughput sequencing data. In *Genome Biol*, nr. 22. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1186/S13059-021-02265-7. ISSN1474-760X.
130. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. In *N Engl J Med* 2018, nr. 379, pp. 1403–1415. ISSN0028-4793.
131. Jouet A. et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. In *Eur Respir J*, nr. 57. Epub ahead of print 1 March 2021. DOI: 10.1183/13993003.02338-2020. ISSN1399-3003.
132. Colman R.E. et al. Whole-genome and targeted sequencing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis on the iSeq100 and MiSeq: A performance, ease-of-use, and cost evaluation. In *PLOS Med* 2019, nr. 16, pp. e1002794. ISSN1549-1676.
133. Cabibbe A.M. et al. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples. In *J Clin Microbiol*, nr. 58. Epub ahead of print 1 October 2020. DOI:

- 10.1128/JCM.00632-20/SUPPL_FILE/JCM.00632-20-SD002.XLSX. ISSN1098660X.
134. Meehan C.J. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. In *Nat Rev Microbiol* 2019 179 2019, nr. 17, pp. 533–545. ISSN1740-1534.
 135. Zignol M. et al. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. In *Lancet Infect Dis* 2018, nr. 18, pp. 675–683. ISSN14744457.
 136. Zwick E.D., Pepperell C.S. Tuberculosis sanatorium treatment at the advent of the chemotherapy era. In *BMC Infect Dis* 2020, nr. 20, pp. 1–11. ISSN14712334.
 137. Fox W., Ellard G.A., Mitchison D.A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. In *Int J Tuberc lung Dis Off J Int Union against Tuberc Lung Dis* 1999, nr. 3, pp. S231-79. ISSN1027-3719 (Print).
 138. Caminero J.A., Scardigli A., Werf T. Van Der. Treatment of drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis.
 139. Ozkaya S. et al. Endobronchial tuberculosis: histopathological subsets and microbiological results. In *Multidiscip Respir Med* 2012, nr. 7, pp. 34. ISSN20496958.
 140. Mitchison D.A. Basic mechanisms of chemotherapy. In *Chest* 1979, nr. 76, pp. 771–781. ISSN0012-3692.
 141. Luna J.A.C. A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians 2004 José A. Caminero Luna International. 2004.
 142. Essential Tuberculosis. In *Essent Tuberc*. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-66703-0.
 143. Riccardi N. et al. Tuberculosis and pharmacological interactions: A narrative review. In *Curr Res Pharmacol Drug Discov* 2021, nr. 2, pp. 100007. ISSN2590-2571.
 144. Jindani A., Doré C.J., Mitchison D.A. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. In *Am J Respir Crit Care Med* 2003, nr. 167, pp. 1348–1354. ISSN1073-449X.
 145. World Health Organisation. TREATMENT OF TUBERCULOSIS Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. Geneva, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf;jsessionid=A650E23D7FD616D4B9946B8477F5528D?sequence=1> (2017, accessed 22 July 2019).
 146. Nahid P. et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and

- Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. În *Clin Infect Dis* 2016, nr. 63, pp. e147–e195. ISSN15376591.
147. Letang E. et al. Tuberculosis-HIV Co-Infection: Progress and Challenges After Two Decades of Global Antiretroviral Treatment Roll-Out. În *Arch Bronconeumol* 2020, nr. 56, pp. 446–454. ISSN0300-2896.
 148. Charoenratanakul S., Dejsomritrutai W., Chaiprasert A. Diagnostic role of fiberoptic bronchoscopy in suspected smear negative pulmonary tuberculosis. În *Respir Med* 1995, nr. 89, pp. 621–623. ISSN0954-6111.
 149. Ahmad Khan F. et al. An updated systematic review and meta-analysis on the treatment of active tuberculosis in patients with HIV infection. În *Clin Infect Dis* 2012, nr. 55, pp. 1154–1163. ISSN1537-6591.
 150. Foe-Essomba J.R. et al. Diabetes mellitus and tuberculosis, a systematic review and meta-analysis with sensitivity analysis for studies comparable for confounders. În *PLoS One* 2021, nr. 16, pp. e0261246. ISSN1932-6203.
 151. Charlie L. et al. Safety and efficacy of high-dose rifampicin in the management of tuberculosis meningitis: Systematic review and meta-analysis. În *Int J Mycobacteriology* 2021, nr. 10, pp. 312. ISSN2212-5531.
 152. Gallardo C.R. et al. Fixed-dose combinations of drugs versus single-drug formulations for treating pulmonary tuberculosis. În *Cochrane database Syst Rev*, nr. 2016. Epub ahead of print 17 May 2016. DOI: 10.1002/14651858.CD009913.PUB2. ISSN1469-493X.
 153. Faust L. et al. The Roll-out of Child-friendly Fixed-dose Combination TB Formulations in High-TB-Burden Countries: A Case Study of STEP-TB. În *J Epidemiol Glob Health* 2019, nr. 9, pp. 210. ISSN22106014.
 154. Gopalan N. et al. Daily vs Intermittent Antituberculosis Therapy for Pulmonary Tuberculosis in Patients With HIV: A Randomized Clinical Trial. În *JAMA Intern Med* 2018, nr. 178, pp. 485–493. ISSN2168-6106.
 155. Sadykova L. et al. A retrospective analysis of treatment outcomes of drug-susceptible TB in Kazakhstan, 2013-2016. În *Medicine (Baltimore)* 2019, nr. 98, pp. e16071. ISSN15365964.
 156. Seid M.A. et al. Drug-susceptible tuberculosis treatment success and associated factors in Ethiopia from 2005 to 2017: a systematic review and meta-analysis. În *BMJ Open* 2018, nr. 8, pp. 22111. ISSN20446055.
 157. Schoenbaechler V. et al. Rate of treatment success and associated factors in the program for

- drug-susceptible tuberculosis in the Forest Region, Republic of Guinea, 2010-2017: A real-world retrospective observational cohort study. *În Int J Infect Dis* 2021, nr. 110, pp. 6–14. ISSN1201-9712.
158. Schutz C. et al. Corticosteroids as an adjunct to tuberculosis therapy. *În Expert Rev Respir Med* 2018, nr. 12, pp. 881. ISSN17476356.
 159. Dorman S.E. et al. Four-Month Rifapentine Regimens with or without Moxifloxacin for Tuberculosis. *În N Engl J Med* 2021, nr. 384, pp. 1705–1718. ISSN0028-4793.
 160. Grace A.G. et al. Shortened treatment regimens versus the standard regimen for drug-sensitive pulmonary tuberculosis. *În Cochrane Database Syst Rev*, nr. 2019. Epub ahead of print 12 December 2019. DOI: 10.1002/14651858.CD012918.PUB2/MEDIA/CDSR/CD012918/IMAGE_N/NCD012918-CMP-002-08.PNG. ISSN1469493X.
 161. Papineni P. et al. TRUNCATE-TB: an innovative trial design for drug-sensitive tuberculosis. *În Int J Infect Dis* 2016, nr. 45, pp. 404. ISSN1201-9712.
 162. A Randomised Trial to Evaluate Toxicity and Efficacy of 1200mg and 1800mg Rifampicin for Pulmonary Tuberculosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02581527> (accessed 26 May 2022).
 163. Clofazimine- and Rifapentine-Containing Treatment Shortening Regimens in Drug-Susceptible Tuberculosis: The CLO-FAST Study - Full Text View - ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04311502> (accessed 26 May 2022).
 164. Chesov D. et al. Treatment outcome in patients with MDR-TB treated with bedaquiline containing regimens, Republic of Moldova. *În Eur Respir J* 2020, nr. 56, pp. 474.
 165. Mbuagbaw L. et al. Outcomes of Bedaquiline Treatment in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. *În Emerg Infect Dis* 2019, nr. 25, pp. 936–943. ISSN1080-6040.
 166. Pym A.S. et al. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drugresistant tuberculosis. *În Eur Respir J* 2016, nr. 47, pp. 564–574. ISSN13993003.
 167. World Health Organization (WHO). Rapid Communication: Key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. *În World Heal Organ* 2019, pp. 6.
 168. Treatment Action Group. The 2021 Tuberculosis Treatment Pipeline Report.
 169. Chesov E. et al. Emergence of bedaquiline resistance in a high tuberculosis burden country. *În Eur Respir J* 2022, nr. 59, pp. 2100621. ISSN0903-1936.
 170. Chesov E. et al. Rezisten a Mycobacterium tuberculosis la Linezolid – mutații asociate și factori de risc : studiu transversal , retrospectiv , analitic. 2021, nr. 26, pp. 43–56.
 171. Van Deun A. et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of

- multidrug-resistant tuberculosis. În *Am J Respir Crit Care Med* 2010, nr. 182, pp. 684–692. ISSN1535-4970.
172. Ndjeka N. et al. Treatment outcomes 24 months after initiating short, all-oral bedaquiline-containing or injectable-containing rifampicin-resistant tuberculosis treatment regimens in South Africa: a retrospective cohort study. În *Lancet Infect Dis*, nr. 0. Epub ahead of print May 2022. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00811-2. ISSN1473-3099.
 173. Esmail A. et al. An All-Oral 6-Month Regimen for Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Multicenter, Randomized Controlled Clinical Trial (the NExT Study). În *Am J Respir Crit Care Med*, nr. 205. Epub ahead of print 15 May 2022. DOI: 10.1164/RCCM.202107-1779OC. ISSN1535-4970.
 174. Chesov D. et al. High-dose isoniazid in the shorter-course multidrug-resistant tuberculosis regimen in the Republic of Moldova. În *Eur Respir J* 2017, nr. 50, pp. 1701340. ISSN1399-3003.
 175. Chesov D. et al. Lack of evidence of isoniazid efficacy for the treatment of MDR/XDR-TB in the presence of the katG 315T mutation. În *Eur Respir J*, nr. 50. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1183/13993003.01752-2017. ISSN13993003.
 176. Nahid P. et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. În *Am J Respir Crit Care Med* 2019, nr. 200, pp. E93–E142. ISSN15354970.
 177. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048> (accessed 14 July 2020).
 178. Lange C. et al. Management of patients with multidrug-resistant tuberculosis. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2019, nr. 23, pp. 645–662. ISSN1027-3719.
 179. GJ F. et al. Surgery as an Adjunctive Treatment for Multidrug-Resistant Tuberculosis: An Individual Patient Data Metaanalysis. În *Clin Infect Dis* 2016, nr. 62, pp. 887–895. ISSN1537-6591.
 180. World Health Orgnaization. The role of surgery in the treatment of pulmonary TB and multidrug- and extensively drug-resistant TB. Copenhagen Danemark, 2014.
 181. Yablonskii P. et al. Robot-assisted surgery in complex treatment of the pulmonary tuberculosis. În *J Vis Surg* 2017, nr. 3, pp. 18–18. ISSN2221-2965.
 182. Kurbatova E. V. et al. Sputum culture conversion as a prognostic marker for end-of-treatment outcome in patients with multidrug-resistant tuberculosis: a secondary analysis of data from two observational cohort studies. În *Lancet Respir Med* 2015, nr. 3, pp. 201–209.

ISSN2213-2600.

183. World Health Organisation. Definitions and reporting framework for tuberculosis-2013 revision. 2013.
184. Günther G. et al. Defining Outcomes of Tuberculosis (Treatment): From the Past to the Future. *În Respiration* 2021, nr. 100, pp. 843–852. ISSN1423-0356.
185. Theron G. et al. Xpert MTB/RIF Results in Patients With Previous Tuberculosis: Can We Distinguish True From False Positive Results? *În Clin Infect Dis* 2016, nr. 62, pp. 995–1001. ISSN1537-6591.
186. Chesov D. et al. Impact of lung function on treatment outcome in patients with TB. *În Int J Tuberc Lung Dis* 2021, nr. 25, pp. 277–284. ISSN1815-7920.
187. Alffenaar J.W.C., Akkerman O.W., Bothamley G. Monitoring during and after treatment. *În ERS Monogr* 2018, nr. 2018, pp. 308–325. ISSN23125098.
188. Treatment of tuberculosis. *În Prescrire Int* 2000, nr. 9, pp. 124–125. ISSN11677422.
189. World Health Organization. What is DOTS ? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS. *În Prev Control* 1999, pp. 1–39.
190. Pradipta I.S. et al. Interventions to improve medication adherence in tuberculosis patients: a systematic review of randomized controlled studies. *În npj Prim Care Respir Med* 2020 301 2020, nr. 30, pp. 1–10. ISSN2055-1010.
191. Ravenscroft L. et al. Video-observed therapy and medication adherence for tuberculosis patients: randomised controlled trial in Moldova. *În Eur Respir J*, nr. 56. Epub ahead of print 1 August 2020. DOI: 10.1183/13993003.00493-2020. ISSN1399-3003.
192. Alffenaar J.W.C. et al. Integrating Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Operational Research to End Tuberculosis. *În Clin Infect Dis* 2020, nr. 70, pp. 1734–1780. ISSN1537-6591.
193. Margineanu I. et al. Practices of therapeutic drug monitoring in tuberculosis: an international survey. *În Eur Respir J*, nr. 59. Epub ahead of print 1 April 2022. DOI: 10.1183/13993003.02787-2021. ISSN0903-1936.
194. Verbeeck R.K. et al. Optimizing treatment outcome of first-line anti-tuberculosis drugs: the role of therapeutic drug monitoring. *În Eur J Clin Pharmacol* 2016, nr. 72, pp. 905–916. ISSN14321041.
195. Martial L.C. et al. Evaluation of dried blood spot sampling for pharmacokinetic research and therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs in children. *În Int J Antimicrob Agents* 2018, nr. 52, pp. 109–113. ISSN1872-7913.
196. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on drug-

- resistant tuberculosis treatment outcome definitions, 17-19 November 2020, <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-report-of-the-who-expert-consultation-on-the-definition-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis%0Ahttps://apps.who.int/iris/handle/10665/340284> (2020).
197. Linh N.N. et al. World Health Organization treatment outcome definitions for tuberculosis: 2021 update. În *Eur Respir J*, nr. 58. Epub ahead of print 1 August 2021. DOI: 10.1183/13993003.00804-2021. ISSN0903-1936.
 198. Günther G. et al. Treatment Outcomes in Multidrug-Resistant Tuberculosis. În *N Engl J Med* 2016, nr. 375, pp. 1103–1105. ISSN0028-4793.
 199. Zong Z. et al. Relapse versus reinfection of recurrent tuberculosis patients in a national tuberculosis specialized hospital in Beijing, China. În *Front Microbiol* 2018, nr. 9, pp. 1858. ISSN1664302X.
 200. Heyckendorf J. et al. Relapse-free cure from multidrug-resistant tuberculosis in Germany. În *Eur Respir J* 2018, nr. 51, pp. 1702122. ISSN0903-1936.
 201. Butov D. et al. Multidrug-resistant tuberculosis in the Kharkiv Region, Ukraine. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2020, nr. 24, pp. 485–491. ISSN18157920.
 202. Chesov D. et al. Failing treatment of multidrug-resistant tuberculosis: A matter of definition. În *Int J Tuberc Lung Dis*, nr. 23. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.5588/ijtld.18.0756. ISSN18157920.
 203. Shean K.P. et al. Treatment outcome and follow-up of multidrug-resistant tuberculosis patients. West Coast/Winelands, South Africa, 1992-2002. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, nr. 12, pp. 1182–1189. ISSN10273719.
 204. Mtafya B. et al. Molecular Bacterial Load Assay Concurs with Culture on NaOH-Induced Loss of Mycobacterium tuberculosis Viability. În *J Clin Microbiol*, nr. 57. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1128/JCM.01992-18. ISSN1098-660X.
 205. Walter N.D. et al. Mycobacterium tuberculosis precursor rRNA as a measure of treatment-shortening activity of drugs and regimens. În *Nat Commun*, nr. 12. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/S41467-021-22833-6. ISSN2041-1723.
 206. Kim Y.J. et al. Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable Mycobacterium tuberculosis in clinical respiratory specimens. În *Ann Lab Med* 2014, nr. 34, pp. 203–209. ISSN2234-3814.
 207. Fukuzawa S., Shiho H., Fujita T. Selective Detection of DNA from Viable Mycobacterium tuberculosis Complex Strains Using the EMA-PCR Method. În *Jpn J Infect Dis* 2019, nr. 72, pp. 19–22. ISSN1884-2836.

208. Sakashita K. et al. Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of MPT64 secretory antigen to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* viability in sputum. *Int J Infect Dis* 2020, nr. 96, pp. 244–253. ISSN1878-3511.
209. Heyckendorf J. et al. Tuberculosis Treatment Monitoring and Outcome Measures: New Interest and New Strategies. *Int J Clin Microbiol Rev*. Epub ahead of print 21 March 2022. DOI: 10.1128/CMR.00227-21. ISSN0893-8512.
210. Heyckendorf J. et al. Prediction of anti-tuberculosis treatment duration based on a 22-gene transcriptomic model. *Int J Tuberc Lung Dis* 2021, nr. 58, pp. 744. ISSN0903-1936.
211. Penn-Nicholson A. et al. RISK6, a 6-gene transcriptomic signature of TB disease risk, diagnosis and treatment response. *Sci Reports* 2020 10:1 2020, nr. 10, pp. 1–21. ISSN2045-2322.
212. Bloom C.I. et al. Detectable Changes in The Blood Transcriptome Are Present after Two Weeks of Antituberculosis Therapy. *PLoS One* 2012, nr. 7, pp. e46191. ISSN1932-6203.
213. Darboe F. et al. Detection of tuberculosis recurrence, diagnosis and treatment response by a blood transcriptomic risk signature in HIV-infected persons on antiretroviral therapy. *Front Microbiol* 2019, nr. 10, pp. 1441. ISSN1664302X.
214. Scriba T.J. et al. Biomarker-guided tuberculosis preventive therapy (CORTIS): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2021, nr. 21, pp. 354–365. ISSN14733099.
215. Musvosvi M. et al. T-cell biomarkers for diagnosis of tuberculosis: candidate evaluation by a simple whole blood assay for clinical translation. *Int J Tuberc Lung Dis*, nr. 51. Epub ahead of print 1 March 2018. DOI: 10.1183/13993003.00153-2018. ISSN0903-1936.
216. Adekambi T. et al. Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response. *J Clin Invest* 2015, nr. 125, pp. 1827–1838. ISSN0021-9738.
217. Zimmer A.J. et al. Biomarkers That Correlate with Active Pulmonary Tuberculosis Treatment Response: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2022, nr. 60, pp. e0185921. ISSN1098660X.
218. Wilson D. et al. Evaluation of Tuberculosis Treatment Response With Serial C-Reactive Protein Measurements. *Open forum Infect Dis*, nr. 5. Epub ahead of print 1 November 2018. DOI: 10.1093/OFID/OFY253. ISSN2328-8957.
219. Wang C. et al. Screening and identification of five serum proteins as novel potential biomarkers for cured pulmonary tuberculosis. *Sci Reports* 2015 5:1 2015, nr. 5, pp. 1–11. ISSN2045-2322.
220. Cai Y. et al. Increased Complement C1q Level Marks Active Disease in Human Tuberculosis. *PLoS One* 2014, nr. 9, pp. e92340. ISSN1932-6203.

221. Ronacher K. et al. Distinct serum biosignatures are associated with different tuberculosis treatment outcomes. *În Tuberculosis* 2019, nr. 118, pp. 101859. ISSN1472-9792.
222. Collins J.M. et al. Tryptophan catabolism reflects disease activity in human tuberculosis. *În JCI Insight*, nr. 5. Epub ahead of print 21 May 2020. DOI: 10.1172/JCI.INSIGHT.137131. ISSN0021-9738.
223. Ravimohan S. et al. Tuberculosis and lung damage: From epidemiology to pathophysiology. *European Respiratory Review*, nr. 27. Epub ahead of print 31 March 2018. DOI: 10.1183/16000617.0077-2017. ISSN16000617.
224. Christof C., Nußbaumer-Streit B., Gartlehner G. WHO Guidelines on Tuberculosis Infection Prevention and Control. 2020. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1055/a-1241-4321. ISSN14394421.
225. The T-SPOT.TB test resources | The T-SPOT.TB test, <https://www.tspot.com/uk/resources/> (accessed 8 December 2022).
226. Essone P.N. et al. Bifunctional T-cell-derived cytokines for the diagnosis of tuberculosis and treatment monitoring. *În Respiration* 2014, nr. 88, pp. 251–261. ISSN1423-0356.
227. Jafari C. et al. Bronchoalveolar Lavage Enzyme-linked Immunospot for a Rapid Diagnosis of Tuberculosis: A Tuberculosis Network European Trialsgroup Study. *În Am J Respir Crit Care Med* 2009, nr. 180, pp. 666. ISSN1073449X.
228. Casey R. et al. Enumeration of Functional T-Cell Subsets by Fluorescence-Immunospot Defines Signatures of Pathogen Burden in Tuberculosis. *În PLoS One* 2010, nr. 5, pp. e15619. ISSN1932-6203.
229. Chiacchio T. et al. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *În J Infect* 2014, nr. 69, pp. 533–545. ISSN1532-2742.
230. Sargentini V. et al. Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. *În BMC Infect Dis*, nr. 9. Epub ahead of print 23 June 2009. DOI: 10.1186/1471-2334-9-99. ISSN1471-2334.
231. Casey R. et al. Enumeration of Functional T-Cell Subsets by Fluorescence-Immunospot Defines Signatures of Pathogen Burden in Tuberculosis. *În PLoS One* 2010, nr. 5, pp. e15619. ISSN1932-6203.
232. Sester U. et al. Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *În PLoS One*, nr. 6. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0017813. ISSN1932-6203.
233. Chesov D. et al. Combined antigen-specific interferon- γ and interleukin-2 release assay

- (FluoroSpot) for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. În *PLoS One*, nr. 10. Epub ahead of print 18 March 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0120006. ISSN1932-6203.
234. Day C.L. et al. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. În *J Immunol* 2011, nr. 187, pp. 2222–2232. ISSN1550-6606.
 235. Crudu V., Romancenco E. Diagnosticul microbiologic al tuberculozei. Chisinau, 2012. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.13140/RG.2.1.4777.6808.
 236. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy The handbook Global edition A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the StopTB Partnership global laboratory initiative advancing TB diagnosis, www.sapathology.sa.gov.au (2013, accessed 2 January 2019).
 237. Toman's Tuberculosis Case detection, treatment, and monitoring-questions and answers SECOND EDITION. 2004.
 238. Zingue D. et al. Automatic microscopic detection of mycobacteria in sputum: a proof-of-concept. În *Sci Rep* 2018, nr. 8, pp. 11308. ISSN2045-2322.
 239. Schneidman M., Dacombe R.J., Carter J. Laboratory professionals in africa: the backbone of quality diagnostics, <http://documents.worldbank.org/curated/en/419941468010480283/pdf/927280WP0Labor00Box385377B00PUBLIC0.pdf> (2014, accessed 19 July 2019).
 240. Yamey G. What are the barriers to scaling up health interventions in low and middle income countries? A qualitative study of academic leaders in implementation science. În *Global Health* 2012, nr. 8, pp. 11. ISSN1744-8603.
 241. Creswell J. et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries. În *BMC Infect Dis*, nr. 14. Epub ahead of print 2 January 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-2. ISSN1471-2334.
 242. Lee J.H. et al. Impact of molecular diagnostic tests on diagnostic and treatment delays in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. În *BMC Infect Dis* 2022, nr. 22, pp. 1–23. ISSN14712334.
 243. Agizew T. et al. Treatment outcomes, diagnostic and therapeutic impact: Xpert vs. smear. A systematic review and meta-analysis. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2019, nr. 23, pp. 82–92. ISSN18157920.
 244. Haraka F. et al. Impact of the diagnostic test Xpert MTB/RIF on patient outcomes for tuberculosis. În *Cochrane Database Syst Rev*, nr. 2021. Epub ahead of print 6 May 2021.

DOI:

10.1002/14651858.CD012972.PUB2/MEDIA/CDSR/CD012972/IMAGE_N/NCD012972-CMP-001.07.SVG. ISSN14651858.

245. Ciobanu A. et al. Do incentives improve tuberculosis treatment outcomes in the Republic of Moldova? În *Public Heal Action* 2014, nr. 4, pp. S59. ISSN22208372.
246. Cates L. et al. Budget impact of next-generation sequencing for diagnosis of TB drug resistance in Moldova. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2022, nr. 26, pp. 963–969. ISSN1815-7920.
247. Mondoni M. et al. Bronchoscopic techniques in the management of patients with tuberculosis. În *Int J Infect Dis* 2017, nr. 64, pp. 27–37.
248. Mondoni M. et al. Bronchoscopic techniques in the management of patients with tuberculosis. În *Int J Infect Dis* 2017, nr. 64, pp. 27–37. ISSN1201-9712.
249. Kim Y.W. et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage and bronchial washing in sputum-scarce or smear-negative cases with suspected pulmonary tuberculosis: a randomized study. În *Clin Microbiol Infect* 2020, nr. 26, pp. 911–916. ISSN1469-0691.
250. Ahmad M. et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in the subset of patients with negative sputum/smear and mycobacterial culture and a suspicion of pulmonary tuberculosis. În *Int J Infect Dis* 2019, nr. 82, pp. 96–101. ISSN18783511.
251. Theron G. et al. Xpert MTB/RIF Results in Patients With Previous Tuberculosis: Can We Distinguish True From False Positive Results? În *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am* 2016, nr. 62, pp. 995. ISSN15376591.
252. Theron G. et al. False-Positive Xpert MTB/RIF Results in Retested Patients with Previous Tuberculosis: Frequency, Profile, and Prospective Clinical Outcomes. În *J Clin Microbiol*, nr. 56. Epub ahead of print 1 March 2018. DOI: 10.1128/JCM.01696-17. ISSN1098-660X.
253. Zifodya J.S. et al. Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. În *Cochrane Database Syst Rev*, nr. 2021. Epub ahead of print 22 February 2021. DOI: 10.1002/14651858.CD009593.PUB5/MEDIA/CDSR/CD009593/IMAGE_N/NCD009593-TST-023.PNG. ISSN14651858.
254. Diacon A.H. et al. Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. În *N Engl J Med* 2014, nr. 371, pp. 723–732. ISSN15334406.
255. Alexandru S. et al. Protocol clinic național; Tuberculoza la adult PCN-123. Chisinau, http://old.ms.md/_files/13333-Protocol%2520TB%2520ADULT%252027%252012%252012.pdf (2016, accessed 31 July

- 2018).
256. Olaru I.D. et al. Bedaquiline-based treatment regimen for multidrug-resistant tuberculosis. În *Eur Respir J*, nr. 49. Epub ahead of print 1 May 2017. DOI: 10.1183/13993003.00742-2017. ISSN13993003.
 257. Olayanju O. et al. Long-term bedaquiline-related treatment outcomes in patients with extensively drug-resistant tuberculosis from South Africa. În *Eur Respir J*, nr. 51. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1183/13993003.00544-2018. ISSN13993003.
 258. Udhwadia Z.F., Ganatra S., Mullerpattan J.B. Compassionate use of bedaquiline in highly drug-resistant tuberculosis patients in Mumbai, India. În *Eur Respir J*, nr. 49. Epub ahead of print 1 March 2017. DOI: 10.1183/13993003.01699-2016. ISSN13993003.
 259. Diacon A.H. et al. Randomized pilot trial of eight weeks of bedaquiline (TMC207) treatment for multidrug-resistant tuberculosis: Long-term outcome, tolerability, and effect on emergence of drug resistance. În *Antimicrob Agents Chemother* 2012, nr. 56, pp. 3271–3276. ISSN00664804.
 260. Guglielmetti L. et al. Compassionate Use of Bedaquiline for the Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Interim Analysis of a French Cohort. În *Clin Infect Dis* 2015, nr. 60, pp. 188–194. ISSN1058-4838.
 261. Skrahina A. et al. Bedaquiline in the multidrug-resistant tuberculosis treatment: Belarus experience. In: *International Journal of Mycobacteriology*. Elsevier Ltd, 2016, pp. S62–S63. ISSN2212554X.
 262. Ahmad N. et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. În *Lancet* 2018, nr. 392, pp. 821–834. ISSN1474547X.
 263. Ciobanu A. et al. Do incentives improve tuberculosis treatment outcomes in the Republic of Moldova? În *Public Heal Action* 2014, nr. 4, pp. S59–S63. ISSN22208372.
 264. Günther G. et al. Treatment Outcomes in Multidrug-Resistant Tuberculosis. În *N Engl J Med* 2016, nr. 375, pp. 1103–1105. ISSN1533-4406.
 265. Chesov D. et al. Failing treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a matter of definition. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2019, nr. 23, pp. 522–524. ISSN1027-3719.
 266. Schnippel K. et al. Effect of bedaquiline on mortality in South African patients with drug-resistant tuberculosis: a retrospective cohort study. În *Lancet Respir Med* 2018, nr. 6, pp. 699–706. ISSN22132619.
 267. Acosta C.D. et al. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward. În *Public Heal Action* 2014, nr. 4, pp. S3. ISSN22208372.

268. Ahmad N. et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *În Lancet* 2018, nr. 392, pp. 821–834. ISSN1474547X.
269. Guglielmetti L. et al. Safety and efficacy of exposure to bedaquiline-delamanid in multidrug-resistant tuberculosis: A case series from France and Latvia. *În Eur Respir J*, nr. 51. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1183/13993003.02550-2017. ISSN13993003.
270. Ndjeka N. et al. Treatment outcomes 24 months after initiating short, all-oral bedaquiline-containing or injectable-containing rifampicin-resistant tuberculosis treatment regimens in South Africa: a retrospective cohort study. *În Lancet Infect Dis* 2022, nr. 22, pp. 1042–1051. ISSN14744457.
271. WHO. WHO: operational handbook on tuberculosis, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340256/9789240022614-eng.pdf> (2022).
272. Lange C. et al. Limited Benefit of the New Shorter Multidrug-Resistant Tuberculosis Regimen in Europe. *În Am J Respir Crit Care Med* 2016, nr. 194, pp. 1029–1031. ISSN1073-449X.
273. Dominguez J. et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *În Int J Tuberc Lung Dis* 2016, nr. 20, pp. 24–42. ISSN1815-7920.
274. Merker M. et al. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *În Genome Med* 2020, nr. 12, pp. 1–8. ISSN1756994X.
275. Grobbel H.P. et al. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *În Clin Infect Dis* 2021, nr. 73, pp. 1194–1202. ISSN1058-4838.
276. Kohl T.A. et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *În PeerJ*, nr. 6. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.7717/PEERJ.5895. ISSN2167-8359.
277. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine), [https://www.who.int/publications/i/item/technical-report-on-critical-concentrations-for-drugsusceptibility-testing-of-isoniazid-and-the-rifamycins-\(rifampicin-rifabutin-and-rifapentine\)](https://www.who.int/publications/i/item/technical-report-on-critical-concentrations-for-drugsusceptibility-testing-of-isoniazid-and-the-rifamycins-(rifampicin-rifabutin-and-rifapentine)) (2021).
278. Ghodousi A. et al. Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Is a Heterogeneous Phenotype Composed of Overlapping MIC Distributions with Different Underlying Resistance Mechanisms. *În Antimicrob Agents Chemother*, nr. 63. Epub ahead of print

2019. DOI: 10.1128/AAC.00092-19. ISSN10986596.
279. Hnizdo E., Singh T., Churchyard G. Chronic pulmonary function impairment caused by initial and recurrent pulmonary tuberculosis following treatment. În *Thorax* 2000, nr. 55, pp. 32–38. ISSN00406376.
 280. Jung J.W. et al. Pulmonary impairment in tuberculosis survivors: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2012. În *PLoS One* 2015, nr. 10, pp. 141230. ISSN19326203.
 281. Ralph A.P. et al. High morbidity during treatment and residual pulmonary disability in pulmonary tuberculosis: Under-recognised phenomena. În *PLoS One*, nr. 8. Epub ahead of print 29 November 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080302. ISSN19326203.
 282. Khosa C. et al. Development of chronic lung impairment in Mozambican TB patients and associated risks. În *BMC Pulm Med*, nr. 20. Epub ahead of print 7 May 2020. DOI: 10.1186/s12890-020-1167-1. ISSN14712466.
 283. Castillo E.G. et al. Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2015 and GOLD 2019 staging: a pooled analysis of individual patient data. În *ERJ Open Res* 2020, nr. 6, pp. 00253–02020. ISSN2312-0541.
 284. Molinos L. et al. Community-acquired pneumonia in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. În *J Infect* 2009, nr. 58, pp. 417–424. ISSN01634453.
 285. Miller M.R. et al. Standardisation of spirometry. DOI: 10.1183/09031936.05.00034805.
 286. Pellegrino R. et al. Interpretative strategies for lung function tests. În *Eur Respir J* 2005, nr. 26, pp. 948–968. ISSN09031936.
 287. Nefedov V., Popova L., Shergina E. [Function in Patients With Chronic Fibrocavernous Tuberculosis]. În *Probl Tuberk Bolezn Legk*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18507144/> (2008, accessed 2 July 2020). ISSN1728-2993.
 288. Nefedov V., Popova L. [Changes in Lung Function in Patients With Newly-Diagnosed Tuberculosis During Treatment With Short Courses of Controlled Drug Therapy]. În *Probl Tuberk*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11763558/> (2001, accessed 2 July 2020). ISSN0032-9533.
 289. Nefedov V., Popova L., Shergina E. [Pulmonary Function in Patients With Infiltrative Pulmonary Tuberculosis]. În *Probl Tuberk Bolezn Legk*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17915466/> (2007, accessed 2 July 2020). ISSN1728-2993.
 290. Nefedov V., Popova L., Shergina E. [Pulmonary Function in Patients With Focal Pulmonary Tuberculosis]. În *Probl Tuberk Bolezn Legk*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18450075/>

- (2008, accessed 2 July 2020). ISSN1728-2993.
291. Nefedov V., Shergina E., Popova L. [Pulmonary Function in Patients With Disseminated Pulmonary Tuberculosis]. În *Probl Tuberk Bolezn Legk*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18041129/> (2007, accessed 2 July 2020). ISSN1728-2993.
 292. Dudnyk A. et al. Initial airflow obstruction in new cases of pulmonary tuberculosis: Complication, comorbidity or missed? În *Indian J Tuberc* 2018, nr. 65, pp. 63–69. ISSN00195707.
 293. Long R. et al. Pulmonary tuberculosis treated with directly observed therapy: Serial changes in lung structure and function. În *Chest* 1998, nr. 113, pp. 933–943. ISSN00123692.
 294. Plit M.L. et al. Influence of antimicrobial chemotherapy on spirometric parameters and pro-inflammatory indices in severe pulmonary tuberculosis. În *Eur Respir J* 1998, nr. 12, pp. 351–356. ISSN09031936.
 295. Guessogo W.R. et al. Physical and functional follow-up of tuberculosis patients in initial intensive phase of treatment in Cameroon using the 6-min walk test. În *J Exerc Rehabil* 2016, nr. 12, pp. 333–339. ISSN2288-176X.
 296. Amere G.A. et al. Contribution of smoking to tuberculosis incidence and mortality in high-tuberculosis-burden countries. În *Am J Epidemiol* 2018, nr. 187, pp. 1846–1855. ISSN14766256.
 297. De La Mora I.L., Martínez-Oceguera D., Laniado-Laborín R. Chronic airway obstruction after successful treatment of tuberculosis and its impact on quality of life. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2015, nr. 19, pp. 808–810. ISSN18157920.
 298. Ravimohan S. et al. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. În *Eur Respir Rev*, nr. 27. Epub ahead of print 31 March 2018. DOI: 10.1183/16000617.0077-2017. ISSN1600-0617.
 299. Rutala D.R. et al. Infection Risks Associated with Spirometry. În *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991, nr. 12, pp. 89–92. ISSN0899-823X.
 300. Kendrick A.H., Johns D.P., Leeming J.P. Infection control of lung function equipment: A practical approach. *Respiratory Medicine* 2003, nr. 97, pp. 1163–1179. ISSN09546111.
 301. Allwood B.W. et al. Post-tuberculosis lung health: Perspectives from the First International Symposium. In: *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), pp. 820–828. ISSN18157920.
 302. Visca D. et al. Pulmonary rehabilitation is effective in patients with tuberculosis pulmonary sequelae. *The European respiratory journal*, nr. 53. Epub ahead of print 1 March 2019.

DOI: 10.1183/13993003.02184-2018. ISSN13993003.

303. Migliori G.B. et al. Clinical standards for the assessment, management and rehabilitation of post-TB lung disease. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2021, nr. 25, pp. 797. ISSN18157920.
304. Ministry of Health of Ukraine. Туберкульоз в Україні Аналітично-статистичний довідник (in Ukrainian). Kiev, 2017.
305. Shah N.S. et al. Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. În *N Engl J Med* 2017, nr. 376, pp. 243–253. ISSN0028-4793.
306. Casali N. et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. În *Nat Genet* 2014, nr. 46, pp. 279–86. ISSN1546-1718.
307. Rieder H.L. Timing of relapse after cessation of anti-tuberculosis chemotherapy. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, nr. 14, pp. 928. ISSN10273719.
308. Dookie N. et al. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. În *Front Microbiol*, nr. 13. Epub ahead of print 24 March 2022. DOI: 10.3389/FMICB.2022.775030. ISSN1664302X.
309. Aung K.J.M. et al. Successful ‘9-month Bangladesh regimen’ for multidrug-resistant tuberculosis among over 500 consecutive patients. În *Int J Tuberc Lung Dis* 2014, nr. 18, pp. 1180–1187. ISSN1815-7920.
310. Schwæbel V. et al. Outcomes of a nine-month regimen for rifampicin-resistant tuberculosis up to 24 months after treatment completion in nine African countries. În *EClinicalMedicine*, nr. 20. Epub ahead of print 1 March 2020. DOI: 10.1016/J.ECLINM.2020.100268. ISSN25895370.

ACTE DE IMPLIMENTARE ȘI CERTIFICATE DE INOVATOR



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5980

Pentru inovația cu titlul
**CITIREA ROBOTIZATĂ A FROTIURILOR DE SPUTĂ
ÎN MICROSCOPIE FLUORESCENTĂ PENTRU
DETECTAREA BACILILOR *M. TUBERCULOSIS* CU
AJUTORUL FLUOROBOT-ULUI**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**CHESOV Dumitru, RUSU Doina,
CRUDU Valeriu, CIOBANU Nelly,
BOTNARU Victor**



Data eliberării 03 februarie 2023



(Semnătura autorizată)





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5978

Pentru inovația cu titlul
UTILIZAREA SPECIMENELOR DE ASPIRAT BRONȘIC ȘI A
TESTULUI XPERT MTB/RIF PENTRU CONFIRMAREA
MICROBIOLOGICĂ A TUBERCULOZEI PULMONARE LA
BOLNAVII CU REZULTATE NEGATIVE A EXAMINĂRILOR
MICROBIOLOGICE ÎN SPUTA LIBER EXPECTORATĂ

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**CHESOV Dumitru, RUSU Doina,
CRUDU Valeriu, CIOBANU Nelly,
BOTNARU Victor**



03 februarie 2023

(Semnătură autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5979

Pentru inovația cu titlul
**DETERMINAREA TIPULUI MUTAȚIEI ASOCIATE CU
REZISTENȚA LA IZONIAZIDĂ LA BOLNAVII DE
TUBERCULOZĂ MULTIDROG REZISTENTĂ (MDR) LA
CARE SE INTENȚIONEAZĂ INCLUDEREA ÎN SCHEMA DE
TRATAMENT A IZONIAZIDEI ÎN DOZE MARI**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**CHESOV Dumitru, RUSU Doina,
CRUDU Valeriu, CIOBANU Nelly,
BOTNARU Victor**



Data emiterii 03 februarie 2023


(Semnătura autorizată)



APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
academician al AȘM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2023

ACTUL nr. 2

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „UTILIZAREA SPECIMENELOR DE ASPIRAT BRONȘIC ȘI A TESTULUI XPERT MTB/RIF PENTRU CONFIRMAREA MICROBIOLOGICĂ A TUBERCULOZEI PULMONARE LA BOLNAVII CU REZULTATE NEGATIVE A EXAMINĂRILOR MICROBIOLOGICE ÎN SPUTA LIBER EXPECTORATĂ”

2. **Autori:** Dumitru CHESOV, dr.șt.med., conf. univ., Doina RUSU, dr.șt.med., conf. univ. Valeriu CRUDU, dr.șt.med., conf. univ. Nelly CIOBANU, Victor BOTNARU, dr.hab. șt.med., prof. univ.

3. **Numărul inovației:** Nr. 5978 din 03 februarie 2023.

4. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutul de fiziopneumologie ”Chiril Draganiuc”, perioada 2018-2023 aa.

5. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea testului Xpert MTB/Rif în probele de aspirat bronșic a demonstrat o acuratețe diagnostică bună (sensibilitate 46,1% (95%CI, 31,6% - 61,4%) și specificitate 98,2% (95%CI, 96,9% - 99,0%)), care oferă plus valoare diagnostică examinării specimenelor de spută liber expectorată.

6. **Rezultatul implementării:** Implementarea permite creșterea cu 24% a ratei de confirmare microbiologică a tuberculozei pulmonare la bolnavii cu rezultate negative ale examinărilor microbiologice în sputa liber expectorată.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Director
IMSP IFP ”Chiril Draganiuc”
dr.șt.med., conf.univ.

Doina RUSU

Șef departament, Departamentul Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI



APROB

Proector pentru activitate de cercetare,
USMF "Nicolae Testemițanu" din RM
academician al AȘM,
prof. univ. dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2023

ACTUL nr.10
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: „DETERMINAREA TIPULUI MUTAȚIEI ASOCIATE CU REZISTENȚA LA IZONIAZIDĂ LA BOLNAVII DE TUBERCULOZĂ MULTIDROG REZISTENTĂ (MDR) LA CARE SE INTENȚIONEAZĂ INCLUDEREA ÎN SCHEMA DE TRATAMENT A IZONIAZIDEI ÎN DOZE MARI”

2. **Autori:** Dumitru CHESOV, dr.șt.med., conf. univ., Doina RUSU, dr.șt.med., conf. univ. Valeriu CRUDU, dr.șt.med., conf. univ. Nelly CIOBANU, Victor BOTNARU, dr.hab. șt.med., prof. univ.

3. **Numărul inovației:** Nr. 5979 din 03 februarie 2023.

4. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutul de ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", perioada 2018-2023 aa.

5. **Eficacitatea implementării:** În baza analizei de argumentare a intervenției mutații în gen katG au fost evidențiate la 90% dintre tulpinile analizate, iar izolat doar în gena inhA doar la 0,7%, în 11,2 % dintre tulpini nu au fost identificate mutații cunoscute în gena katG sau inhA.

6. **Rezultatul implementării:** Implementarea permite evitarea administrării neraționale și potențial toxice a dozelor mari de izoniazidă la bolnavii cu tuberculoză MDR cu rezistență crescută față de acest preparat, care constituie peste 90% dintre toți bolnavii cu acest tip de rezistență.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Director
IMSP IFP "Chiril Draganiuc"
dr.șt.med., conf.univ.

Doina RUSU

Șef departament, Departamentul Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

Suf. Hoza.



APROB

Prorector pentru activitate de cercetare,
USMF "Nicolae Testemițanu" din RM
academician al ASM,
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Stanislav GROPPA

2023

ACTUL nr. 11

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „CITIREA ROBOTIZATĂ A FROTIURILOR DE SPUTĂ ÎN MICROSCOPIE FLUORESCENTĂ PENTRU DETECTAREA BACILILOR *M. TUBERCULOSIS* CU AJUTORUL FLUOROBOT-ULUI”

2. **Autori:** Dumitru CHESOV, dr.șt.med., conf. univ., Doina RUSU, dr.șt.med., conf. univ. Valeriu CRUDU, dr.șt.med., conf. univ. Nelly CIOBANU, Victor BOTNARU, dr.hab. șt.med., prof. univ.

3. **Numărul inovației:** Nr. 5980 din 03 februarie 2023.

4. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Institutul de fiziopneumologie "Chiril Draganiuc", perioada 2018-2023 aa.

5. **Eficacitatea implementării:** Sistemul Fluorobot de citire robotizată frotiurilor fluorescente destinate examenului microscopic a demonstrat o sensibilitate de 70% și specificitate de 82% în probele de spută liber expectorate examinate în scop diagnostic la bolnavii cu tuberculoză pulmonară

6. **Rezultatul implementării:** Citirea robotizată prin Fluorobot poate substitui citirea manuală de către personalul de laborator, ceea ce permite redistribuirea resurselor umane a diviziunii spre alte examinări microbiologice mai laborioase.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Director
IMSP IFP "Chiril Draganiuc"
dr.șt.med., conf.univ.

Doina RUSU

Șef departament, Departamentul Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena RAEVSCHI

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctor habilitat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Chesov Dumitru

05/06/2023

INFORMAȚII PERSONALE

CURRICULUM VITAE DUMITRU CHESOV



Data nașterii 23.07 1983

Cetățenia Republica Moldova

✉ dumitru.chesov@usmf.md

LOCUL DE MUNCA PENTRU CARE SE CANDIDEAZĂ

Conferențiar universitar, Disciplina de pneumologie și alergologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

Ianuarie 2019- prezent	Conferențiar universitar Disciplina de pneumologie și Alergologie, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Ianuarie 2011- 2019	Asistent universitar Disciplina de pneumologie și Alergologie, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Aprilie 2018 - prezent	Cercetător științific Laboratorul Clinica bolilor infecțioase, Centrul de cercetări din Borstel, Germania
Septembrie 2014 - Octombrie 2019	Metodist Coordonator Departamentul Știință, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Aprilie 2011 - Septembrie 2011	Șef Secție Secția de Monitorizare și Evaluarea a programului Național de control al TB, IFP "Chirila Draganiuc", Moldova
Octombrie 2010- Aprilie 2011	Cercetător științific stagiar Laboratorul, Boli nespecifice ale aparatului respirator
Septembrie 2008 -Iunie 2010	Laborant Catedra Medicină internă nr.1, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova

EDUCAȚIE ȘI FORMARE

Septembrie 2014 - Septembrie 2017	Master în managementul sănătății publice Școala de management în sănătate publică, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Noiembrie 2010 - Mai 2014	Doctor în științe medicale Studii prin doctorat specialitatea boli interne (pulmonologie), USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Noiembrie 2007 - Iulie 2010	Medic specialist Boli interne Studii prin rezidențiat specialitatea boli interne, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova
Septembrie 2001 - Iunie 2007	Medic Facultatea Medicină, USMF "Nicolae Testemițanu", Moldova

ACTIVITATE DE CONSULTANȚĂ ȘI EXPERTIZARE

- | | |
|----------------|--|
| 2013 - prezent | <ul style="list-style-type: none">- Institute of Health and Medical Social Assistance, Moldova;- Friedrich Ebert Stiftung (Moldova office);- Centre for Health Policies and Studies. (PAS), Moldova;- ERS College of Experts, Lausanne, Elveția |
|----------------|--|

CALIFICĂRI PROFESIONALE

- | | |
|-----------------|--|
| Mai 2019 | Medic Pneumolog categoria superioară |
| Septembrie 2013 | Certificare HERMES diploma europeană de calificare în medicină respiratorie a adultului. |
| Mai 2013 | Medic pneumolog categoria a doua |

IMPLICARE ÎN PROIECTE DE CERCETARE

- | | |
|-------------|--|
| 2018 - 2020 | Cercetător consultant
East European Study Site, DZIF |
| 2018 - 2020 | Consultant
CARE common action against HIV/ TB/HCV across the regions of Europe |
| 2015 - 2018 | Consultant
International TB Portals Program |
| 2016 - 2018 | Investigator local principal
New Generation of IGRA in immunocompromised individuals (TBnet#54) |
| 2016 - 2018 | Investigator clinic
An Integrated Tabletop Platform for Rapid Detection of XDR-TB in Clinical Samples, NIH |
| 2013 | Investigator principal
Treatment responses in patients with pulmonary tuberculosis, ERS Short Term Fellowship |
| 2011-2014 | Investigator Clinic
GCCD Global Consortium for Drug Resistant Tuberculosis, NIH |

PROIECTE EDUCAȚIONALE

- | | |
|-----------|-----------------------|
| 2015-2018 | REACH 4 Moldova, DAAD |
|-----------|-----------------------|

ACTIVITATE EDITORIALĂ

- | | |
|----------------|---|
| 2017- prezent | Editor Asociat/ Membru al colegiului de redacție <ul style="list-style-type: none">- International Journal of Tuberculosis and Lung Disease;- European Clinical Respiratory journal;- Moldovan Journal of Health Science. |
| 2013 - prezent | Recenzent (reviewer) |

- International Journal of Tuberculosis and Lung Disease (IJTLD);
- Respiration;
- Current Respiratory Medicine Reviews;
- Folia Medica;
- Clinical Microbiology and Infection

PUBLICAȚII

Publicații științifice	80
Citări Web of Science	497
H index	13

MEMBRU AL SOCIETĂȚILOR DE PROFIL

2010 - prezent	European Respiratory Society
2010 - prezent	TBNET – Tuberculosis European Trial Group
2011 - prezent	VIAREMO – Societatea de respirologie din Moldova
2013 - prezent	International Union Against tuberculosis and Lung Diseases

COMPETENȚE PERSONALE

Alte limbi străine cunoscute	Limba maternă		Româna			
			INTELEGERE		VORBIRE	
			Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral
Engleza			C1	C1	C1	C1
Rusa			C2	C2	C2	C2
Franceza			A2	A2	A2	A2

Competențe digitale Operarea la nivel avansat: OS Windows, MS OFFICE, SPSS